

Institut für Pflanzenkrankheiten  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

---

**Wirkung verschiedener Abwehrproteine auf phytopathogene *Pilze in vitro* und ihre Resistenzwirkung in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr.agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 16.05.02

von

**Olaf Brinkmann**

aus Bösel-Petersdorf

Referent: Prof. Dr. H.-W. Dehne

Korreferenten: Prof. Dr. J. Léon

Dr. W. Gieffers

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2003

D 98

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W., 1999.

The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes.

FEBS Letters, 449: 93-100

# Kurzfassung

**Olaf Brinkmann**

**Wirkung verschiedener Abwehrproteine auf phytopathogene Pilze *in vitro* und ihre Resistenzwirkung in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen.**

Die Entwicklung von Transformations- und Klonierungstechniken eröffnet neue Wege in der Züchtung von Kulturpflanzen. Durch diese Verfahren wird es möglich, Gene aus verschiedenen Organismen in Pflanzen zu exprimieren. Ziel der molekularen Pflanzenzüchtung ist die Verbesserung von Qualitätsfaktoren der Kultursorten und die Erhöhung der Krankheitsresistenz insbesondere gegen phytopathogene Pilze. Durch die Übertragung von Fremdgenen, die für Abwehrproteine codieren, kann die Basisresistenz von Pflanzen verändert werden. In dieser Arbeit wurden transgene Kartoffel- und Tabakpflanzen, die die Abwehrproteine Glukanase, Chitinase, RIP oder Kombinationen dieser Proteine exprimierten, mit Hilfe eines Blattscheibentests auf ihre Anfälligkeit gegen wichtige phytopathogene Pilze untersucht.

Die Expression von Glukanase und Chitinase in Tabak führte zu einem signifikant verringerten Befall mit den Pathogenen *Botrytis cinerea* und *Phytophthora nicotianae*. Durch die Kombination dieser beiden Abwehrproteine konnte im Vergleich zu Einzelkonstrukten nur eine geringfügig erweiterte Erhöhung der quantitativen Resistenz festgestellt werden. Auch die Kombinationen Glukanase/Chitinase, Glukanase/RIP und RIP/Chitinase in Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée führte zu einer deutlich verringerten Anfälligkeit gegen *Phytophthora infestans*, aber nicht zu einer Erhöhung der Resistenz, die über die Wirkung eines einzelnen Resistenzproteins hinausging.

Für das T4-Lysozym war bislang nur eine bakterizide Wirkung bekannt. Anhand von *in vitro*-Untersuchungen konnte eine hemmende Wirkung auf keimende Sporen phytopathogener Pilze festgestellt werden. Auch enzymatisch inaktives Lysozym und die Peptide A4 und A23 des T4-Lysozyms wiesen die gleiche Wirkung auf keimende Pilzsporen auf. Dieser Effekt kann wahrscheinlich auf die Wirkung amphipathischer Helices auf Zellmembranen zurückgeführt werden. Mit Hilfe eines Fluoreszenztests konnte die membranschädigende Wirkung des T4-Lysozyms auf Pilzsporen nachgewiesen werden.

Die Expression des T4-Lysozyms in der Kartoffelsorte Désirée unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors führte zu einer signifikanten Befallsverringerung nach Inokulation mit *Phytophthora infestans*. Bei Expression des Proteins unter der Kontrolle des induzierbaren Mannopinsynthase-Promotors konnte jedoch kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Transgene T4-Lysozym exprimierende Linien der Kartoffelsorten Panda und Secura, die eine hohe bzw. niedrige natürliche Resistenz gegen *P. infestans* besitzen, zeigten ebenfalls deutlich verringerten Befall mit diesem Erreger.

# Abstract

**Olaf Brinkmann**

**Effect of several resistance proteins on phytopathogenic fungi *in vitro* and the resistance effect of these proteins in transgenic potato and tobacco plants.**

The development of plant transformation and cloning techniques has opened new possibilities in plant breeding research. With these new techniques now it is possible to transfer genes from different organisms into plants. The objectives of molecular plant breeding are to optimise crop quality and to increase the disease resistance of plants to phytopathogenic fungi. Especially, the basic resistance of plants can be improved by the transfer of foreign genes coding for pathogenesis related proteins. In this paper transgenic potato and tobacco plants expressing the PR-proteins glucanase, chitinase, RIP, or a combination of two of these proteins, respectively, were studied for their resistance to several fungal plant diseases using a leaf disc assay.

Tobacco lines expressing glucanase or chitinase, resp., showed significantly reduced infection with the pathogens *Botrytis cinerea* and *Phytophthora nicotianae*. In comparison to these lines, the combination of the two PR-proteins led only to a slight further enhancement of resistance of tobacco plants. Furthermore, the co-expression of glucanase/chitinase, glucanase/RIP or RIP/chitinase, resp., in the potato variety Désirée resulted in significantly reduced disease symptoms after infection with *Phytophthora infestans* but not to a resistance increase higher than the resistance of lines expressing only one foreign protein.

The lysozyme of the T4 bacteriophage is known to be bactericidal. Using *in vitro* assays, an inhibitory effect on germinating spores of phytopathogenic fungi was detected in this work. The same effect was shown for enzymatic inactive T4-lysozyme and for the synthesised peptides A4 and A23 of the C-terminus of T4-lysozyme. Thus, the fungistatic effect is likely ascribed to the membrane disturbing activity of amphipathic helices these peptides are coding for. Using a fluorescence test the membrane disturbing activity of T4-lysozyme on fungal spores could be proven.

The expression of T4-lysozyme in potato plants (var. Désirée) under control of the 35S-promoter confers significantly increased resistance to *Phytophthora infestans*. Whereas potato plants expressing the T4-lysozyme gene under control of the mannopine-synthase promoter showed no significant *Phytophthora* resistance. Further resistance tests indicate that transgenic T4-lysozyme expressing potato lines of the varieties Panda and Secura, which have high or low natural resistance to *Phytophthora* leaf blight, resp., show significant enhanced resistance, too.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.1 Pathogene .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1.1 Biologie des Pathogens <i>Phytophthora infestans</i> .....                           | 4         |
| 2.1.2 Biologie des Pathogens <i>Phytophthora nicotianae</i> .....                          | 6         |
| 2.1.3 Biologie des Pathogens <i>Alternaria solani</i> .....                                | 8         |
| 2.1.4 Biologie des Pathogens <i>Botrytis cinerea</i> .....                                 | 10        |
| <b>2.2 Molekulare Resistenzzüchtung .....</b>  | <b>11</b> |
| 2.2.1 Abwehrproteine .....   | 11        |
| 2.2.2 Lysozyme .....   | 16        |
| 2.2.3 Transgene Pflanzen mit Abwehrproteinen .....   | 18        |
| <b>2.3 Aufgabenstellung .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.1 Geräte .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.2 Materialien .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.3 Pathogenisolate .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.4 Nährmedien und Puffer .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>3.5 Pflanzenmaterial .....</b>  | <b>27</b> |
| 3.5.1 Kartoffelsorten .....  | 27        |
| 3.5.2 Glukanase und RIP exprimierende Tabaklinien .....                                    | 27        |
| 3.5.3 Glukanase, Chitinase und RIP exprimierende Kartoffellinien .....                     | 29        |
| 3.5.4 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorten Désirée und Panda .....             | 29        |
| 3.5.5 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Secura .....                         | 30        |
| 3.5.6 Lysozym exprimierende Kartoffellinien mit Mannopinsynthase-Promotor .....            | 31        |
| <b>3.6 Pflanzenanzucht .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.6.1 Tabakpflanzen .....  | 32        |
| 3.6.2 Kartoffelpflanzen .....  | 34        |
| <b>3.7 Erhaltung, Sporulation und Inokulation der Erreger .....</b>                        | <b>35</b> |
| 3.7.1 <i>Phytophthora infestans</i> .....  | 35        |
| 3.7.2 <i>Phytophthora nicotianae</i> .....   | 35        |
| 3.7.3 <i>Alternaria solani</i> .....   | 36        |
| 3.7.4 <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium ssp.</i> ..... | 36        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.8 <i>In vitro</i>-Wirkung verschiedener Lysozyme und Peptide</b>              | <b>37</b> |
| 3.8.1 Keimschlauchlängentests mit Lysozymen und Peptiden                           | 37        |
| 3.8.2 Sytox-Färbetests   | 39        |
| <b>3.9 Resistenztests</b>  | <b>40</b> |
| 3.9.1 Blattscheibentests in Bewässerungsboxen                                      | 40        |
| 3.9.2 Bonitur der Blattscheibentests   | 42        |
| <b>3.10 Statistik</b>  | <b>44</b> |
| <br>   |           |
| <b>4 ERGEBNISSE</b>  | <b>45</b> |
| <b>4.1 Transgene Pflanzen mit den Abwehrproteinen Glukanase, Chitinase und RIP</b> | <b>45</b> |
| 4.1.1 Resistenzuntersuchungen an transgenem Tabak                                  | 45        |
| 4.1.2 Resistenzuntersuchungen an transgenen Kartoffeln                             | 54        |
| <b>4.2 Antimikrobielle Wirkung des Lysozyms <i>in vitro</i></b>                    | <b>56</b> |
| 4.2.1 Keimschlauchlängentests  | 56        |
| 4.2.2 Sytox-Färbetest  | 63        |
| <b>4.3 Antimikrobielle Wirkung des Lysozyms <i>in planta</i></b>                   | <b>64</b> |
| 4.3.1 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Désirée                      | 64        |
| 4.3.2 Lysozym exprimierende Kartoffellinien mit Mannopinsynthase-Promotor          | 68        |
| 4.3.3 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Secura                       | 69        |
| 4.3.4 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Panda                        | 72        |
| <br>   |           |
| <b>5 DISKUSSION</b>  | <b>74</b> |
| 5.1 Methodik der quantitativen Resistenzprüfung                                    | 75        |
| 5.2 Transgene Pflanzen mit den Abwehrproteinen Glukanase, Chitinase und RIP        | 77        |
| 5.3 <i>In vitro</i> -Wirkung von Lysozymen gegen phytopathogene Pilze              | 84        |
| 5.4 Resistenzwirkung von Lysozymen in transgenen Kartoffelpflanzen                 | 88        |
| <br>   |           |
| <b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>96</b> |
| <br>   |           |
| <b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>98</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| A23          | Peptid A23 aus T4-Lysozym            |
| A4           | Peptid A4 aus T4-Lysozym             |
| BSA          | Rinderserumalbumin                   |
| CaMV         | Cauliflower mosaic virus             |
| CHI-A        | Exochitinase                         |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid                     |
| dpi.         | dies post infectionem                |
| E.c.a.       | <i>Erwina carotovora atroseptica</i> |
| E.c.c.       | <i>Erwinia carotovora carotovora</i> |
| f.sp.        | formae speciale                      |
| GLU          | Glukanase                            |
| HEWL         | Hühnereiweißlysozym                  |
| kb           | Kilobasenpaare                       |
| kDa          | Kilodalton                           |
| MAR-Regionen | matrix-associated-region             |
| mas-Promotor | Mannopinsynthase-Promotor            |
| nptII        | Neomycinphosphotransferasegen II     |
| PBS          | phosphate buffer solution            |
| PDA          | potato dextrose agar                 |
| PDB          | potato dextrose broth                |
| PR-Protein   | pathogenesis-related protein         |
| RIP          | Ribosomen-inaktivierendes Protein    |
| ssp.         | subspecies                           |
| T4-Lys       | T4-Lysozym                           |
| upm.         | Umdrehungen pro Minute               |
| UV           | Ultraviolett                         |





## 1. Einleitung

Kulturpflanzen sind in ihrer natürlichen Umwelt einer Vielzahl von ertragsbegrenzenden Faktoren ausgesetzt. Neben abiotischen Umwelteinflüssen und tierischen Schädlingen führen hauptsächlich Pflanzenkrankheiten zu empfindlichen Ertragseinbußen. Die Erreger der wichtigsten und schwerwiegendsten Pflanzenkrankheiten sind Bakterien und Viren, hauptsächlich aber Pilze.

Durch eine Vielzahl von Züchtungsmethoden und –ansätzen versuchte die klassische Pflanzenzüchtung in den vergangenen Jahrzehnten die jeweils aktuellen Sorten der verschiedenen Kulturpflanzen in ihrer Resistenz gegenüber den wichtigsten Krankheiten zu verbessern. Dabei wird noch heute oft auf Resistenzen verwandter Wildpflanzen zurückgegriffen und durch verschiedene Kreuzungsschritte das gewünschte Merkmal in die Kultursorte integriert. Dieses Verfahren ist jedoch nur bei monogenen Resistenzen effektiv und bewirkt in der Regel eine rassenspezifische Resistenz, die bei Etablierung kompatibler Rassen schnell überwunden werden kann. Besonders erfolgreiche Resistenzmechanismen sind dagegen auf das Zusammenwirken mehrerer Gene zurückzuführen. Hierdurch entstehen quantitative Resistenzen von hoher Wirksamkeit und großer Langlebigkeit. Das Einkreuzen solcher Resistenzen aus Wildpflanzen ist jedoch, ohne die Kultureigenschaften einer modernen Ertragsorte zu verändern, kaum möglich.

In der Kartoffelzüchtung beispielsweise ist das Verfahren des Einkreuzens rassenspezifischer Resistenzgene aus verwandten Pflanzenarten vielfach angewendet worden. So gelang es durch das Einkreuzen sog. R-Gene aus *Solanum demissum*, die eine Hypersensibilitäts-Reaktion verursachen, Kartoffelsorten zu züchten, die nahezu vollständig resistent gegen bestimmte Erregerassen von *Phytophthora infestans* waren. Diese Resistenzen waren jedoch immer nur zeitlich begrenzt wirksam und wurden innerhalb weniger Jahre von kompatiblen Rassen des Erregers „überwunden“ (SCHÖBER-BUTIN, 1998).

Teilerfolge der Resistenzzüchtung, wie sie bei der Kartoffelzüchtung erzielt wurden, konnten für andere Kulturen bzw. für andere Krankheiten nicht erreicht werden, da verwandte Pflanzenarten, die natürliche Resistenzmechanismen besitzen, fehlen (Bsp.: Halmbruchkrankheit (*Pseudocercospora herpotrichoides*) an Getreide; bakterielle Krankheiten der Kartoffel; Krankheiten der Ölfrüchte u.v.a.).

Aufgrund der verhältnismäßig hohen Krankheitsanfälligkeit von Hohertragsorten der meisten Kulturpflanzenarten ist der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln bei großflächigem Anbau unerlässlich. Nur durch die Verwendung chemischer Präparate (insbesondere Fungizide) können die wichtigsten Kulturarten vor dem Befall mit

Krankheitserregern geschützt und somit Ertragseinbußen für Landwirte erheblich verringert werden. Moderne Pflanzenschutzmittel bieten effektiven Schutz vor diesen Krankheiten, bewirken jedoch immer auch einen Eingriff in den Naturhaushalt, der besonders in den vergangenen Jahren immer kritischer von der Öffentlichkeit betrachtet wurde.

Andererseits stehen für sehr viele Pflanzenkrankheiten, die durch Bakterien und Viren hervorgerufen werden, bis heute keine Pflanzenschutzmittel zur großflächigen und kostengünstigen Bekämpfung zur Verfügung. So läßt sich die Ausbreitung der meisten Virosen und Bakteriosen nur über phytosanitäre Maßnahmen in Grenzen halten.

Die Einführung biotechnologischer Methoden führt seit einigen Jahren zu einer schrittweisen Modernisierung der Pflanzenzüchtung. Insbesondere die Verwendung der Gentechnik erlaubt es, Gene über Artgrenzen hinweg gezielt in eine Kultursorte einzuführen, ohne die Ertragsmerkmale zu beeinflussen. Im Vergleich zur klassischen Züchtung besteht somit die Möglichkeit, die Eigenschaften aktueller Sorten innerhalb kurzer Zeit zu verbessern.

Für die molekulare Resistenzzüchtung bieten sich drei Strategien zur Verbesserung der Resistenz von Kultursorten gegen Phytopathogene:

1. Das Einbringen von Proteinen oder sekundären Wirkstoffen mit gezielter Wirkung auf angreifende Pathogene.
2. Direkter Eingriff in die Wirt-Pathogen-Interaktion durch die Expression neuer Proteine oder sekundärer Wirkstoffe (z.B. durch Neutralisation von Pathogenitätsfaktoren).
3. Steigerung der bereits vorhandenen Resistenzmechanismen (z.B. durch gentechnisch induzierte Erhöhung der Expression einzelner Abwehrproteine).

Mit Hilfe verschiedener Resistenzmerkmale und insbesondere durch die Kombination der verschiedenen Strategien können vermutlich sehr effiziente und dauerhafte Resistenzen gegen Pflanzenpathogene erzeugt werden.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Chancen der Gentechnik, die durch das Einbringen neuer Resistenzmerkmale in Kulturpflanzen möglich werden, für die Resistenzzüchtung gegen pilzliche Krankheitserreger darzulegen. Dabei werden moderne Methoden der Biotechnologie mit klassischen Methoden der Phytopathologie verbunden, um die Resistenzeigenschaften transgener Pflanzen zu überprüfen. Insbesondere wurde hier die Strategie des Einbringens antimikrobieller Proteine mit zielgerichteter Wirkung gegen phytopathogene Erreger verfolgt. Untersucht wurde dabei, inwieweit verschiedene Resistenzproteine, die pflanzlicher, bakterieller oder viraler Herkunft sind, die Anfälligkeit transgener Kartoffel- und Tabakpflanzen gegen

wichtige pilzliche Pathogene verringern können. Mit Hilfe eines einfach zu handhabenden und exakten Blattscheibentests wurden dazu die verschiedenen transgenen Linien untersucht. Darüber hinaus wurden zur Aufklärung der Wirksamkeit der Abwehrproteine *in vitro*-Tests zur Bestimmung der Effektivität einzelner Stoffe durchgeführt

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Pathogene

#### 2.1.1 Biologie des Pathogens *Phytophthora infestans*

Die Kraut- und Knollenfäule ist die bedeutendste und schwerwiegendste Krankheit im Kartoffelbau und ist in allen Kartoffelanbauregionen der Welt mit Ausnahme der heißen, bewässerten Gebiete verbreitet. Sie verursacht große wirtschaftliche Schäden durch den Befall der Pflanzen im Feld sowie durch den Befall der Knollen während der Lagerung. In den feucht-kühlen Regionen Mitteleuropas werden die durchschnittlichen Verluste auf 8-10 % der Gesamternte geschätzt (HOFFMANN, 1999). Verursacher der Krankheit ist der Erreger *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (AGRIOS, 1988; HOOKER, 1983; RICH, 1983).

*P. infestans* befällt Blätter, Stengel und Knollen von Kartoffelpflanzen. Im Feld tritt der Befall des Erregers an Blättern zunächst in Form dunkler oder wässriger, punktförmiger Flecken auf. Diese Flecken weiten sich aus zu braun-schwarzen nekrotischen Läsionen (RICH, 1983). Häufig beginnt der Befall an den Blatträndern oder –spitzen der unteren Blätter. Die Befallsfläche ist mit einem hellgrünen bis gelben Hof umgeben. Zum Teil sind nekrotisierte Bereiche aber auch scharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt. Bei starkem Befall bilden sich im Befallsverlauf graue Sporangienrasen insbesondere auf den Blattunterseiten (HOFFMANN, 1999). Gelegentlich werden Sporangien auch bereits auf noch scheinbar intakten Blattbereichen gebildet.

Unter feuchten, mäßig warmen Witterungsbedingungen schreitet der Befall sehr schnell voran. Die Nekrosen an einem Blättchen breiten sich rasch auf das gesamte Fiederblatt und später über den Stengel auf die gesamte Pflanze aus. Durch die sich mit Wind und Wasser verbreitenden Sporangien kann bei entsprechender Witterung ein Kartoffelfeld innerhalb weniger Tage vollständig vernichtet werden (HOFFMANN, 1999).

Mit *P. infestans* befallene Kartoffelknollen zeigen zunächst flache, braune Vertiefungen der Schale. Der als Knollenfäule bezeichnete Befall dringt in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur immer tiefer in die Knolle ein. Das befallene Gewebe grenzt sich nur unscharf vom gesunden ab. Häufig führt sekundärer Befall mit Bakterien oder anderen pilzlichen Erregern zur völligen Zerstörung der infizierten Knollen (AGRIOS, 1988).

Die Gattung *Phytophthora* gehört in der Klasse der *Oomycetae* zur Ordnung der *Peronosporales* und zur Familie der *Pythiaceae*.

*P. infestans* vermehrt sich in der Regel durch ungeschlechtliche Sporangien. Diese sind zitronenförmig, dünnwandig, hyalin und besitzen an ihrer Spitze eine Papille. Sie sind zwischen 21-38 und 12-23 µm groß und bilden sich endständig an verzweigten Sporangienträgern. Diese treten in der Regel aus den Spaltöffnungen der befallenen Blattregionen aus. Sporangien können direkt mit einer Hyphe keimen und eine Pflanze infizieren (RICH, 1983; SCHÖBER & ULLRICH, 1985). Häufiger bilden sich jedoch in den Sporangien Zoosporen, die durch eine Papille in das umgebende Wasser entlassen werden. Aus einem Sporangium können sich ca. 6-16 Zoosporen bilden, die sich mit ihrer doppelten Geißel frei im Wasser bewegen (HOFFMANN et al., 1994). Zoosporen sind in Abhängigkeit von der Temperatur für einige Stunden mobil, enzystieren aber dann an der Oberfläche des Blattes. Sie bilden dort einen Keimschlauch (CARLILE, 1983), der die Epidermis des Blattes mit Hilfe eines Appressoriums durch die Kutikula penetriert. In selteneren Fällen wächst ein Keimschlauch auch durch eine Spaltöffnung in das Pflanzengewebe ein. Das unseptierte Myzel von *P. infestans* wächst zunächst interzellulär im Gewebe des Wirtes, bildet aber auch intrazelluläre Haustorien (COFFEY & WILSON, 1983).

Die geschlechtliche Vermehrung von *P. infestans* erfolgt durch Vereinigung einer Oogonie mit einem Antheridium. Daraus entsteht eine etwa 24-46 µm große Oospore, die einen Keimschlauch bildet, an dessen Ende in der Regel ein Sporangium entsteht. Dieses Sporangium wiederum kann wie im normalen Infektionsprozess einen Keimschlauch oder Zoosporen zur Infektion des Wirtes bilden (AGRIOS, 1988; HOOKER, 1983).

Die sexuelle Reproduktion des Pilzes war lange Zeit auf die mittel- und südamerikanischen Ursprungsländer beschränkt, da nur dort neben dem weltweit verbreiteten Sexualtyp A1 auch der Typ A2 vorkam. Seit den 80er Jahren ist der Sexualtyp A2 auch in Mitteleuropa nachgewiesen (HOFFMANN et al., 1994; HOFFMANN, 1999; SCHEFFER, 1997; UMAERUS et al., 1983).

Die Überwinterung des Pilzes erfolgt als Myzel in Knollen, die bei der Ernte im Boden verblieben sind, häufiger jedoch in infizierten Pflanzknollen. Zu Beginn des Pflanzenwachstums nach dem Auspflanzen befällt der Erreger den jungen Stengel sowie die unteren Blätter und produziert so ein Primärinokulum. Die gebildeten Sporangien werden mit Wind und Regenspritzern verbreitet. Vom Befallsherd ausgehend, weitet sich die Infektion schließlich im gesamten Bestand aus (HOFFMANN, 1999).

Die durch Regenwasser von befallenen Pflanzen auf den Boden gespülten Sporangien können Zoosporen entlassen, die oberflächennahe Knollen infizieren. Dabei dringen die Zoosporen durch Wunden oder Lentizellen in die Knollen ein. Auch bei der Ernte

kann eine Infektion des Erntegutes erfolgen. Durch den Kontakt der Knollen mit infiziertem Kraut oder durch luftbürtige Sporangien gelangt Inokulum auf die Knollen, das bei der späteren Lagerung der Ernte Befall hervorrufen kann.

Andere Wirte von *P. infestans* sind Tomate und Aubergine. Beide haben jedoch in unseren Regionen als Winterwirte keine Bedeutung.

Der Befall mit dem Erreger schreitet besonders bei mäßig warmer und feuchter Witterung schnell voran. Optimale Bedingungen zur Sporangienproduktion ergeben sich bei 16-22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 %. Die Sporangien werden über mittlere Distanzen mit dem Wind verbreitet, verlieren jedoch bei einer Luftfeuchtigkeit von unter 80 % schnell ihre Lebensfähigkeit (AGRIOS, 1988).

Sowohl für eine Infektion mit Sporangien als auch mit Zoosporen ist ausreichend Feuchtigkeit erforderlich. Zoosporen überleben ausschließlich in einem Wasserfilm. Die optimale Temperatur für den Zoosporenschlupf liegt zwischen 12 und 16 °C (HOFFMANN, 1999). Die günstigste Temperatur für die Bildung von Keimschläuchen direkt aus Sporangien beträgt 24 °C. Nach der Infektion des Wirtes erfolgt die Ausbreitung des Pilzes am schnellsten bei 17-21 °C. Sehr hohe Temperaturen und Trockenheit verhindern das Wachstum des Pilzes, abgetötet wird er dadurch jedoch nicht (AGRIOS, 1988; SCHÖBER & ULLRICH, 1985).

### 2.1.2 Biologie des Pathogens *Phytophthora nicotianae*

Der bodenbürtige Erreger *Phytophthora nicotianae* ist Verursacher einer schweren Wurzel- und Stammfäule an Tabak. Er befällt alle kultivierten Tabakarten und ist in den wichtigsten Anbauregionen Afrikas, Nord- und Südamerikas, Asiens und Osteuropas verbreitet (NYVALL, 1989). Besonders schwere Schäden entstehen in wärmeren Gebieten, während in kühleren Regionen diese Krankheit nur selten auftritt.

Die Bezeichnung für die ausschließlich den Tabak befallene Variation *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae* ist umstritten. Auch die Abgrenzung zwischen den Variationen *nicotianae* und *parasitica* innerhalb der Art wird noch diskutiert (ERWIN, 1983; GALLEGLY, 1983). Sehr häufig verwendet wird daher auch der Name *P. parasitica* var. *nicotianae*. (ERWIN, 1983).

*P. nicotianae* befällt im Boden zunächst die Wurzeln der Tabakpflanzen. Es können jedoch alle Pflanzenteile in allen Entwicklungsstadien befallen werden. Besonders anfällig sind Jungpflanzen bei feuchtwarmer Witterung. Eine Infektion in diesem Stadium zeigt sich anfänglich durch Verbräunung des Stengels in Bodennähe. Der

Befall breitet sich jedoch sehr schnell auf die gesamte Pflanze aus, bis sie schließlich abstirbt (SHEW, 1991).

Ältere Pflanzen zeigen als erstes Symptom ein Welken der Blätter an heißen Tagen. Bei stärkerem Befall verfärben sich diese Blätter gelb und hängen schlaff herab. In diesem Stadium, in dem noch kein Befall an den oberen Pflanzenteilen zu erkennen ist, sind bereits einige der Wurzeln schwarz gefärbt oder sogar schon abgetötet (SHEW, 1991).

Im weiteren Verlauf der Krankheit wird auch der Stengel befallen. Dieser verfärbt sich bis zu einer Höhe von ca. 30 cm über dem Boden ebenfalls schwarz. Damit verbunden ist eine Verbräunung des Stengelmarks, das eintrocknet und eine typische Querschäuerung aufweist (KLINKOWSKI et al., 1974). Durch die starke Schädigung des Stengels und der damit verbundenen Störung des Wasser- und Assimilatestroms werden auch die Blätter braun und nekrotisch.

Eine Infektion der unteren Blätter geschieht bei feuchter Witterung oder Regen durch Kontakt mit verseuchtem Boden. Auf den Blättern entstehen dann zunächst hellgrüne, wäßrige Flecken, die sich schnell ausbreiten. Diese Bereiche werden im weiteren Befallsverlauf stark nekrotisch und verfärben sich dunkelbraun.

Das Myzel des Pilzes ist hyalin, unseptiert und mißt 3-11 µm im Durchmesser. Die Sporangien sind rundlich bis eiförmig und besitzen eine Papille (BRANDENBURGER, 1984). Ihre Größe liegt zwischen 23-79 x 16-54 µm und ist abhängig vom Isolat und vom Medium (KRÖBER, 1985). Sie keimen direkt durch Bildung von Keimhyphen oder indirekt durch Produktion von Zoosporen. Die Zoosporen sind 7-11 µm groß und besitzen zwei Geißeln. Sie bleiben nach dem Schlüpfen für einige Stunden bewegungsfähig, bevor sie enzystieren und der Infektionsprozess mit der Bildung einer Keimhyphne beginnt (SHEW, 1991).

Als weitere Sporenform bildet *P. nicotianae* 20-40 µm große kugelige Chlamydosporen (BRANDENBURGER, 1984). Sie entstehen sowohl in befallenen Geweben als auch in Agarkulturen und sind zunächst farblos und durchsichtig, später aber goldbraun gefärbt. Die sexuelle Vermehrung erfolgt durch Bildung von Oosporen nach Kopulation von Antheridien und Oogonien. Zur Zeit sind vier Rassen von *P. nicotianae* bekannt. Die Rasse 0 ist in allen Gebieten vorherrschend (SHEW, 1991).

Die optimalen Temperaturbereiche von *P. nicotianae* liegen bei 25-30 °C für das Wachstum, bei 15-32 °C für die Sporangienproduktion und bei 17-27 °C für die Zoosporenbildung (WESTE, 1983). Bei einer Temperatur von 22-28 °C entwickelt sich der Befall besonders schnell (SHEW, 1991).

Bodenfaktoren wie Wasserpotential, Bodentemperatur, Nährstoffgehalt und pH-Wert beeinflussen entscheidend die Epidemiologie des Erregers. Bodentemperaturen über 20 °C und ein pH-Wert zwischen 6 und 7 bieten optimale Bedingungen für die Verbreitung des Pilzes. Für die Entlassung von Zoosporen ist eine Wassersättigung des Bodens erforderlich. Bestehen diese Temperatur- und Wasserbedingungen im Boden, bewegen sich die Zoosporen durch Chemotaxis zielgerichtet auf die Wurzeln der Tabakpflanzen zu, enzystieren und keimen dort. An befallenen Pflanzenteilen werden dann innerhalb kurzer Zeit Sporangien gebildet, die als Sekundärinokulum dienen.

Beim Zerfall infizierter Pflanzengewebe werden Chlamydosporen frei und verbleiben im Boden. Dort bleiben sie mehrere Jahre lebensfähig und dienen später als Primärinokulum. Dabei keimen sie und infizieren Wurzeln von Wirtspflanzen direkt oder bilden zunächst Sporangien, die wiederum Zoosporen zur Infektion entlassen (SHEW, 1991).

Die Verbreitung des Bodenpilzes erfolgt durch oberflächlichen Abtrag des Bodens, durch Regen oder über Bewässerungssysteme. Eine Übertragung von Feld zu Feld kann durch Ackergeräte und Verpflanzen von Jungpflanzen erfolgen. Dementsprechend sind Kontrollmaßnahmen vor allem darauf ausgerichtet, die Ausbreitung des Erregers zu verhindern. Durch Einhaltung langer Anbaupausen und Verwendung resistenter Tabaksorten kann der Schaden durch *P. nicotianae* begrenzt werden (NYVALL, 1989).

### 2.1.3 Biologie des Pathogens *Alternaria solani*

*Alternaria solani* (Sorauer) ist ein weltweit verbreiteter Erreger, der unter den Kulturpflanzen beispielsweise Kartoffel und Tomaten, aber auch Pfeffer und Aubergine, stärker befällt und eine Blattfleckenkrankheit verursacht. In Mitteleuropa treten größere Schäden nur bei höheren Temperaturen mit häufig wechselnden feuchten und trockenen Witterungsbedingungen auf (HOFFMANN, 1999). *A. solani* führt bei der Kartoffel zur ‚Dürrfleckenkrankheit‘, die außer Blattinfektionen auch Stengelbefall und Knollenfäule verursacht. Dabei tritt der Pilz häufig in Kombination mit dem Erreger *A. alternata* auf.

Typische Symptome, die an den unteren Blättern und zunehmend an älteren Pflanzen erscheinen, sind dunkle, nekrotische Blattflecken. Diese sind scharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt und gelegentlich von einem gelben Hof umgeben. Anfangs bilden sich punktförmige Nekrosen, die sich durch wechselnde Tages- und Nachttempera-



turen oft in konzentrischen Ringen ausdehnen. Im weiteren Befallsverlauf kann es zum Absterben des gesamten Blattes kommen.

Mit *A. solani* befallene Kartoffelknollen zeigen schwarze, eingesunkene Flecken, die als Hartfäule bezeichnet werden (HOFFMANN, 1999).

Der Pilz bildet große (15-19 x 150-300 µm), vielzellige Konidien mit mehreren Längs- und Quersepten. Diese Konidien sind langgestreckt, keulenförmig und dunkel gefärbt. Sie werden einzeln an i.d.R. unverzweigten Konidienträgern gebildet und ihr charakteristischer „Schnabel“ ist mindestens ebenso lang wie der Konidienkörper (ELLIS, 1971). Zur Anregung der Sporulation ist langwelliges UV-A-Licht erforderlich. Die Verletzung des Myzels fördert ebenfalls die Sporulationsbereitschaft des Pilzes.

*A. solani* überwintert als Myzel an Pflanzenresten, infizierten Knollen oder anderen Solanaceen. Aufgrund der relativen Resistenz junger Pflanzen gegenüber *A. solani* tritt stärkerer Befall in Abhängigkeit von der Witterungslage erst spät in der Anbauzeit, häufig erst zur Blüte auf. Für Infektion und Sporulation des Erregers sind längere Feuchtigkeitsphasen durch Regen oder Tau notwendig. Die Verbreitung der Konidien hingegen geschieht bei trockenem Wetter vor allem durch Wind. Wechselhafte Witterungsverhältnisse mit längeren trockenen und feuchten Abschnitten begünstigen daher die Ausbreitung der Dürrfleckenkrankheit in Kartoffelbeständen (ROTEM, 1994).

Die Infektion von Wirtspflanzen erfolgt in der Regel durch direkte Penetration der Keimschläuche in die Epidermis. Ein Eindringen von Hyphen in das pflanzliche Gewebe ist allerdings auch durch die Spaltöffnungen möglich.

Allgemein werden ältere Blätter von *A. solani* stärker befallen als jüngere Blätter. Dies begründet auch die höhere Befallshäufigkeit an bereits abreifenden Kartoffelpflanzen. Größere Anfälligkeit gegenüber der Dürrfleckenkrankheit zeigen auch unzureichend mit Nährstoffen versorgte Pflanzen. Spät reifende Kartoffelsorten gelten allgemein als resistenter als frühe Sorten.

Unverletzte Kartoffelknollen sind gegenüber *A. solani* weitgehend resistent. Über Verletzungen der Knollenschale (Periderm), die häufig bei der Ernte entstehen, kann der Erreger jedoch die Knolle infizieren. Allerdings breitet sich der Pilz bei der Lagerung nur wenig aus, so daß wirtschaftliche Schäden gering bleiben.

Bei der Pathogenese von *A. solani* sind, wie bei vielen anderen *Alternaria*-Arten, Toxine beteiligt. Für den Erreger wurden bisher nur wirtsunspezifische Toxine, wie Alternaric Acid, Zinniol, Altersolanol, Tentoxin oder Macrosporin, entdeckt (ROTEM, 1994, ROTH et al., 1990).

Natürliche Resistenzen gegenüber *A. solani* in wilden *Solanum*-Arten sind sehr selten. Einige spätreifende Arten zeigen eine geringere Anfälligkeit für *A. solani*. Vermutlich ist

dies jedoch eher auf die Physiologie der Pflanzen zurückzuführen als auf eine genetisch bedingte Resistenz (ROTEM, 1994).

#### **2.1.4 Biologie des Pathogens *Botrytis cinerea***

Der Erreger *B. cinerea* ist in den warmen und gemäßigten Klimaten verbreitet und besitzt einen außerordentlich großen Wirtspflanzenkreis. Der Pilz ist sowohl zur saprophytischen als auch zur parasitären Lebensweise befähigt. Keimlinge, Blätter, Blüten, Zweige und Früchte werden von diesem Erreger befallen. So ist *B. cinerea* beispielsweise für den Grauschimmel an Erdbeeren, die Beerenfäule an Weinreben, die Blütenfäule der Sonnenblume und die Umfallkrankheiten vieler Gemüsearten verantwortlich und richtet in diesen Kulturen erhebliche Schäden an. Besondere Bedeutung hat *B. cinerea* beim Unterglasanbau von Zierpflanzen und Gemüse. Hier sind umfangreiche Pflanzenschutzmaßnahmen erforderlich, um den Erreger zu kontrollieren.

Im Tabakanbau verursacht *B. cinerea* zu zwei Zeitpunkten besondere Schäden. Zunächst werden junge Tabaksämlinge bereits vor dem Auspflanzen bei feuchter Witterung an den unteren Blättern befallen. Diese Blätter verfärben sich gelb, und der Befall kann sich bei anhaltend regnerischem Wetter auf die gesamten Pflanzen ausbreiten. Später können sich charakteristische Sklerotien an den befallenen Geweben bilden. Der zweite Befallsschwerpunkt des Erregers fällt in die Blüte des Tabaks. Dort wo Blütenblätter auf Laubblätter fallen und haften bleiben, bilden sich typische Blattflecken. Diese entstehen durch die Besiedlung der Blütenblätter mit *B. cinerea* und den raschen Übergang des Erregers in das Blattgewebe (LUCAS & SHEW, 1991).

Typische Befallssymptome von *B. cinerea* sind Weichfäulen. An den oft braunen nekrotischen Geweben bilden sich rasch charakteristische, graubraune Konidienrasen. Diese Konidienrasen bestehen aus braunen, leicht gedrehten Konidienträgern, die häufig di- oder trichotom verzweigt sind (DOMSCH & GAMS, 1993). An diesen Conidiophoren bilden sich terminal Konidienmutterzellen, die mehrere farblose bis blaßbraune Konidien hervorbringen. Die Konidien sind überwiegend ellipsoid, weichwandig und haben eine Größe von 8-14 x 6-9 µm (BRANDENBURGER, 1984). Das Myzel von *B. cinerea* ist septiert und zunächst farblos, färbt sich jedoch mit zunehmendem Alter braun (LUCAS & SHEW, 1991).

Konidien werden in großer Zahl an befallenen Geweben gebildet und in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit mit dem Wind oder mit Regenspritzern verbreitet (JARVIS, 1980).

Die Überdauerung des Erregers erfolgt entweder in Form von Myzel an befallenen Pflanzenresten oder mit Hilfe von Sklerotien, die dunkelbraun bis schwarz gefärbt sind und eine maximale Größe von 15 mm erreichen (DOMSCH & GAMS, 1993). Sklerotien von *B. cinerea* können je nach Witterungsverhältnissen einige Jahre im Boden überdauern und auf drei verschiedene Arten keimen. Auf künstlichen Nährmedien ist häufig die Bildung von neuem Myzel zu beobachten. Diese Art der Keimung ist im Feld jedoch selten. Dort werden von Sklerotien i.d.R. Konidienträger und Konidien gebildet, die dann als Primärinokulum dienen. Die dritte Möglichkeit der Keimung ist die Bildung von Apothezien und entspricht der Sporulation der Hauptfruchtform *Botryotinia fuckelinana*. Die Formation von Apothezien wird jedoch nur äußerst selten beobachtet und hat somit keine Bedeutung im Entwicklungskreislauf des Erregers (COLEY-SMITH, 1980).

Die Infektion von Pflanzen erfolgt i.d.R. über Konidien oder Myzel. Konidien von *B. cinerea* keimen auf der Pflanzenoberfläche und bilden einen Keimschlauch, an dessen Ende häufig ein Appressorium entsteht. Innerhalb des Appressorium entwickelt sich ein Penetrationskeil, der mechanisch in die Epidermis eindringt (VAN DEN HEUVEL & WATERREUS, 1983). Pflanzen werden aber auch häufig über Myzel infiziert. Nicht selten übertragen infizierte Pflanzenteile einen Botrytisbefall durch Kontakt mit gesunden Pflanzenteilen, wie z.B. durch befallene Früchte oder Blütenblätter. Bei diesem Infektionsprozeß übernehmen zellwandabbauende Enzyme, die vom Myzel sekretiert werden, eine entscheidende Rolle. Durch die Enzyme werden die Zellwandstrukturen der Pflanzenzellen aufgelöst, und das Myzel kann in das Wirtsgewebe eindringen (VERHOEFF, 1980).

## **2.2 Molekulare Resistenzzüchtung**

### **2.2.1 Abwehrproteine**

Zu den bei Pathogenbefall in Pflanzen ausgelösten biochemischen Prozessen gehören die Produktion und die Anreicherung sogenannter ‚pathogenesis-related proteins‘, kurz PR-Proteine (STINTZI et al., 1993; PRELL, 1996; VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Van Loon und van Kammen (1970) beschrieben als erste die Anreicherung löslicher Proteine nach TMV-Infektion und Hypersensitivreaktion von Tabakblättern. Bis heute

sind für eine Vielzahl von mono- und dikotylnen Pflanzen (u.a. Kartoffel, Tomate, Mais, Gerste, Weizen, Erbse, Ackerbohne) ebenfalls PR-Proteine in den verschiedenen Pflanzenorganen nachgewiesen (CARUSO et al., 1999; DANN et al., 1996; GARCIA-GARCIA et al., 1994; KOMBRINK et al., 1988; MAUCH et al., 1988a; MAUCH et al., 1988b; VIDHYASEKARAN, 1997).

Die Bildung von PR-Proteinen ist eine Abwehrreaktion, die u.a. durch Infektion der Pflanzen mit Viren, Pilzen oder Bakterien induziert wird. PR-Proteine sind jedoch nicht pathogenspezifisch (MEINS & AHL, 1989). Je nach Art der Induktionsquelle werden aber unterschiedliche PR-Proteine in unterschiedlichen Mengen aktiviert (BREDERODE et al., 1991). Die Induktion der Proteine erfolgt bei Infektion der Pflanze mit einem Pathogen, aber auch bei Verwundung, Nekrosebildung und Hypersensitivreaktionen (VAN LOON, 1985). Gesunde Pflanzen zeigen in der Regel nur geringe Gehalte der meisten Abwehrproteine. Dennoch kann die Konzentration bestimmter PR-Proteine insbesondere in blühenden Pflanzen oder seneszenten Blättern erhöht sein (FRASER, 1981). Auch durch die Zugabe verschiedener chemischer Substanzen wie Ethylen oder Acetylsalicylsäure sowie unter Einfluß von abiotischem Streß können Pflanzen mit vermehrter Bildung von Abwehrproteinen reagieren (BREDERODE et al., 1991; CHRIST & MÖSINGER, 1989; PIERPOINT et al., 1981; Ye et al., 1989). Die Bildung von PR-Proteinen ist daher sowohl als Antwort auf abiotischen Streß als auch als aktive Pathogenabwehr zu verstehen.

Bei Befall einer Pflanze durch einen Pathogen sind PR-Proteine zunächst im Bereich der Infektionsstellen lokalisiert. Im weiteren Befallsverlauf reichern sie sich auch in entfernteren Gewebebereichen an. Die höchsten Konzentrationen sind jedoch an den Rändern der Befallsstellen nachzuweisen (VAN LOON & VAN KAMMEN, 1970).

Alle PR-Proteine haben mit 15-40 kD verhältnismäßig geringe Molekulargewichte und zeichnen sich durch Unempfindlichkeit gegenüber pflanzlichen Proteasen aus (PIERPOINT, 1981). PR-Proteine lassen sich nach Struktur und Funktion in fünf Klassen einteilen (PR-1 bis PR-5). Zudem werden basische Proteine, die sich überwiegend in der Zellvakuole anreichern, von sauren Proteinen, die in den Interzellularraum sekretiert werden, unterschieden.

Proteine der PR-1-Gruppe vermitteln verstärkte Resistenz gegenüber Oomyceten (ALEXANDER et al., 1993). Ihre Wirkung gegenüber *Phytophthora infestans* wurde von Nidermann und Mitarbeitern (1995) *in vitro* nachgewiesen. Dennoch ist der pilzhemmende Wirkmechanismus der PR-1 Proteine noch nicht aufgeklärt. Sie beruht aber offenbar nicht auf Enzymfunktionen (NIDERMAN et al., 1995).

In der Gruppe PR-2 der Abwehrproteine sind die  **$\beta$ -1,3-Glukanasen** zusammengefaßt, deren enzymatische Wirkung in der hydrolytischen Spaltung von  $\beta$ -1,3-Glukan-

polymeren besteht (LEUBNER-METZGER & MEINS, 1999; KOMBRINK et al., 1988). Da die Zellwände vieler pilzlicher Pathogene u.a. aus Glukanen bestehen, scheint ihre Rolle im Abwehrprozeß der Pflanze eindeutig. Induziert wird die Bildung der Glukanasen jedoch nicht nur durch Pathogenbefall oder Streß. Bei der Keimung von Samen, bei der Blütenbildung und zur Fruchtreife wurden ebenfalls PR-2-Proteine gefunden (YUN et al., 1997).

Die Gruppe der PR-2-Proteine wird in drei Klassen eingeteilt. Glukanasen der Klasse I sind basische, vakuoläre Isoformen des Enzyms, von denen angenommen wird, daß sie besonders durch hormonelle Prozesse der Pflanze gesteuert werden (FELIX & MEINS, 1986). Sie werden nicht nur durch Pathogeninduktion sondern auch in gesunden Pflanzen z.B. in Wurzeln und älteren Blättern in größeren Mengen akkumuliert (BEFFA & MEINS, 1996; KEEFE et al., 1990).

Proteine der Klasse II sind saure Isoformen, die extrazellulär angereichert werden. Anders als die Enzyme der Klasse I sind sie nicht in gesunden Pflanzen nachzuweisen und werden nur nach Induktion durch ein Pathogen oder durch chemische Reize gebildet (WARD et al., 1991). Diese Klasse wird weiterhin in PR-2a, b und c (früher PR-2, PR-N und PR-O) eingeteilt. Die dritte Klasse schließlich beinhaltet ein einziges saures Enzym, das PR-Q, das im Apoplasten von Pflanzen gefunden wurde (PAYNE et al., 1990). Die enzymatische Aktivität der PR-2 Proteine wurde u.a. von Mauch und Mitarbeitern (1988 b) *in vitro* gegenüber verschiedenen Pilzen nachgewiesen.

Die dritte Gruppe der PR-Proteine (PR-3) bilden die **Chitinasen**. Da Pflanzen kein Chitin enthalten, die Zellwände vieler Pilze jedoch zu einem großen Teil aus Chitin bestehen, liegt die Vermutung nahe, daß Chitinasen am Abwehrprozeß insbesondere gegen pilzliche Erreger beteiligt sind. Chitinhaltige Zellwände haben u.a. Ascomyceten, Basidiomyceten und Deuteromyceten. Der Chitingehalt ihrer Zellwände liegt zwischen 3 und 60 % (BARTNICKI-GARCIA, 1968).

PR-3 Proteine werden in vier Klassen (I-IV) eingeteilt und besitzen ein relativ breites pH-Optimum um pH 6 (BOLLER et al., 1983; PUNJA & ZHANG, 1993).

Chitinasen werden wie die Glukanasen durch Pathogenbefall oder abiotischen Streß induziert. Geringe Gehalte von PR-3 Proteinen liegen auch in gesunden Pflanzen vor. Die einzelnen Isoformen der Chitinase unterliegen dabei unterschiedlichen Regulationen in der Pflanze, so daß der Anteil einzelner Chitinasen im Laufe der Entwicklung einer Pflanze und in den verschiedenen Organen variiert (GARCIA-GARCIA et al., 1994; MAUCH et al., 1988a; NEUHAUS, 1999; TRUDEL et al., 1989).

Die Enzymaktivität der PR-3 Proteine gegen verschiedene Pilze wurde u.a. von Mauch und Mitarbeitern (1988b), Schlumbaum und Mitarbeitern (1986) sowie Melchers und Mitarbeitern (1994) nachgewiesen. Dabei zeigte sich insbesondere im Bereich der

Hyphenspitzen eine starke Chitinaseaktivität (MAUCH et al., 1988b; WUBBEN et al., 1997). Die Hyphenspitzen wiesen zunächst eine charakteristische Schwellung auf, bevor im weiteren Verlauf der Behandlung die Zellwand stark zersetzt wurde (BENHAMOU et al., 1993; ORDENTLICH, 1988). Collinge und Mitarbeiter (1993) nehmen dazu an, daß ältere Hyphen mit Polysacchariden oder Proteinen überzogen sind und dadurch einen gewissen Schutz vor dem Angriff der Enzyme besitzen. An den Hyphenspitzen, wo diese Ummantelung fehlt, reichern sich die hydrolytischen Enzyme an, zersetzen die pilzliche Zellwand und können so zum Absterben der Hyphe führen (BENHAMOU et al., 1993).

Proteine der Gruppe PR-4 sind bereits in mehreren Pflanzenarten nachgewiesen worden. Dabei handelt es sich um Proteine, die große Ähnlichkeit zu den Produkten der wundinduzierbaren Gene *win1* und *win2* sowie dem Prohevein zeigen (LINTHORST et al., 1991; WUBBEN et al., 1997). PR-4 Proteine werden, je nach Vorhandensein bzw. Fehlen einer N-terminalen Chitin-Bindedomäne, in die Klassen I und II eingeteilt. Die Proteine dieser Gruppe zeigen deutlich Wirkung gegen mehrere pilzliche Pathogene, ihr genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt (LINTHORST et al., 1991; PONSTEIN et al., 1994).

Als thaumatinähnliche Proteine werden die der Gruppe PR-5 zugeordneten Proteine bezeichnet. Der Name ist auf die Ähnlichkeit zu einem ‚süßen‘ Protein aus den Beeren der afrikanischen Frucht *Thaumatococcus daniellii* zurückzuführen. Die Mitglieder dieser Gruppe werden auch als Osmotine bezeichnet. Osmotine sind in einigen Pflanzen nach osmotischem Streß induzierte vakuoläre Proteine (SHEWRY & LUCAS, 1997). *In vitro* zeigten PR-5 Proteine hemmende und lytische Wirkung auf Hyphenspitzen von *P. infestans* (WOLOSHUK et al., 1991). Wie bei den Abwehrproteinen der Gruppen PR-1 und PR-4 sind auch die genauen antimikrobiellen Wirkmechanismen der PR-5 Proteine noch nicht bekannt.

Da bei der natürlichen Induktion von PR-Proteinen durch Pathogene häufig Chitinasen in Verbindung mit den  $\beta$ -1,3-Glukanasen beobachtet wurden, haben sich viele Arbeiten mit der **kombinierten Wirkung Glukanasen und Chitinasen** beschäftigt (JI & KUC, 1996; LORITO et al., 1996; MAUCH et al., 1988a; MAUCH et al., 1988b; MELCHERS et al., 1994; SELA-BUURLAGE et al., 1993). Im Metabolismus von nicht gestreßten Pflanzen übernehmen die beiden Enzymgruppen grundlegend verschiedene Aufgaben (GARCIA-GARCIA et al., 1994). Zur Pathogenabwehr werden Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glukanasen jedoch über die gleichen Mechanismen induziert und übernehmen dabei durch ihre Rolle als zellwandabbauende Enzyme auch vergleichbare Aufgaben.

Mauch und Mitarbeiter (1988b) untersuchten als erste *in vitro* die kombinierte Wirkung hydrolytischer Enzyme aus Erbsen auf verschiedene Pathogene. Dabei zeigte sich, daß Chitinase allein auf *Trichoderma viride* und  $\beta$ -1,3-Glukanase allein auf *Fusarium solani* f.sp. *pisi* eine Hemmwirkung hatte. Alle anderen untersuchten Pathogene (u.a. *Alternaria solani* und *Monilia fructigena*) wurden durch die Zugabe dieser Enzyme im Wachstum nicht beeinflusst. Dagegen bewirkte die Kombination von  $\beta$ -1,3-Glukanase und Chitinase bei allen Pilzen ein stark verringertes Myzelwachstum.

Synergistische Effekte beim Abbau pilzlicher Zellwände bei Anwesenheit von Chitinase und  $\beta$ -1,3-Glukanase aus Tabak werden auch von Sela-Burlage und Mitarbeitern (1993) beschrieben. Die Autoren stellten jedoch fest, daß nur bei der Kombination bestimmter Klassen von Enzymen diese Effekte auftreten. So zeigte eine Klasse-II-Glukanase in Kombination mit verschiedenen Chitinasen keine synergistische Wirkung gegen *Fusarium solani*.

Ähnliche Ergebnisse beschreiben Ji und Kuc (1996) von einer untersuchten  $\beta$ -1,3-Glukanase und drei Isoformen von Chitinase aus Gurken (*Cucumis sativus* L.). Nur die  $\beta$ -1,3-Glukanase bewirkte bei geringen Konzentrationen signifikant verringerte Konidienkeimung und verringertes Myzelwachstum von *Colletotrichum lagenarium*. Zwei der isolierten Chitinasen hatten keine inhibierende Wirkung, während eine dritte Chitinase nur bei höheren Konzentrationen (1 mg/ml) das Wachstum des Pilzes hemmte. Bei Kombination dieser Chitinase mit einer  $\beta$ -1,3-Glukanase zeigte sich eine zellwandabbauende und wachstumshemmende Wirkung.

Weit verbreitet im Pflanzenreich und bei einigen Bakterienarten sind **Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP)**, die eine besondere Gruppe von Abwehrproteinen darstellen. Sie wurden bislang u.a. in Weizen (Tritin), Gerste, Mais, Ricinus (Ricin) und Spargel (Asparin 1 und 2) gefunden (STIRPE et al., 1992). RIPs sind N-Glycosidasen, die eukaryotische Ribosomen inaktivieren und dadurch die Proteinsynthese hemmen. Bemerkenswert ist dabei, daß pflanzeigene Ribosomen oder Ribosomen von nah verwandten Arten nicht beeinträchtigt werden. Dies ließ vermuten, daß RIPs an den Abwehrprozessen von Pflanzen gegen Pathogen beteiligt sind (ENDO et al., 1988; JENSEN et al., 1999; SHEWRY & LUCAS, 1997; STIRPE & BARBIERI, 1986; STIRPE & HUGHES, 1989; VIVANCO et al., 1999).

Ribosomen inaktivierende Proteine werden in zwei Gruppen eingeteilt. RIPs vom Typ 1 sind einfache Polypeptidketten. RIPs von Typ 2 besitzen eine Lektin-Domäne, die an Zelloberflächen binden kann. Dadurch sind diese Proteine besonders zelltoxisch insbesondere für Säugetierzellen (STIRPE et al., 1992). Allgemein variiert der

Wirkungsgrad von Ribosomen-inaktivierenden Proteinen gegen Ribosomen verschiedener Organismen sehr stark. RIPs vom Typ 1 zeigen jedoch gegen pilzliche Ribosomen deutlich stärkere Toxizität als gegen Säugetierzellen (ROBERTS & SELITRENNIKOFF, 1986; SHEWRY & LUCAS, 1997).

Ein aus Gerstenkörnern stammendes Typ 1 RIP zeigte *in vitro* hemmende Wirkung auf das Myzelwachstum von *Fusarium sporotrichoides* und *Trichoderma reesii* (LEAH et al., 1991). Wurden das RIP mit  $\beta$ -1,3-Glukanase oder Chitinase kombiniert, traten synergistische Effekte bei der inhibierenden Wirkung des Myzels auf.

### 2.2.2 Lysozyme

Bereits 1922 wurde von A. Fleming, dem Entdecker des Penicillins, eine bakteriostatische Wirkung des Lysozyms beschrieben. Bis heute gehören Lysozyme aus Hühnereiweiß und Bakteriophagen zu den am besten erforschten Proteinen. Lysozyme, die u.a. in Tränenflüssigkeit und in Nasensekret von Säugetieren sowie in Eiklar von Vögeln vorkommen, sind Enzyme mit bakteriziden Eigenschaften. Aber auch Bakterien (z.B. *E. coli*), Bakteriophagen, Insekten und Pflanzen produzieren Enzyme dieser Gruppe (SCHLEGEL & SCHMIDT, 1992; VILCINSKAS & MATHA, 1997).

Lysozyme wirken sowohl gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Bakterien. Ihre Wirkung gegen Gram-positive Bakterien ist jedoch deutlich stärker als gegen Gram-negative Bakterien, die nur unter Zugabe von komplexbildenden Reagenzien hydrolysiert werden (PELLEGRINI et al., 1992; SCHLEGEL & SCHMIDT, 1992; SHEWRY & LUCAS, 1997).

Lysozyme sind Muramidasen, die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen der Mucopolysaccharid-Zellwände von Bakterien hydrolysieren und somit den Abbau des in Bakterienzellwänden enthaltenen Mureins verursachen. Die bakterizide Wirkung wird daher allgemein auf die Enzymfunktion zurückgeführt. Durch den Abbau des Mureinsacks platzen die Bakterienzellen in hyper- oder hypotonischen Lösungen (SCHLEGEL & SCHMIDT, 1992).

Die Funktion der Lysozyme in Sekreten von Wirbeltieren und in Hühnereiweiß liegt in der Abwehr von Bakterien. Auch bei Pflanzen, die ebenfalls Lysozyme bilden, könnten diese Proteine an der Bekämpfung bakterieller Erreger beteiligt sein. Der Beweis hierfür fehlt allerdings bis heute (DÜRING, 1993). Pflanzliche Lysozyme besitzen allgemein eine stärkere Chitinaseaktivität als Muramidaseaktivität. Insbesondere saure, extrazelluläre Formen des Proteins sind schwache Lysozyme (MAJEAU et al., 1990; TRUDEL et al., 1989). Pflanzliche Lysozyme zählen somit zu den PR-Proteinen der



Gruppe 3. Die Aufgabe diese Enzymgruppe in Pflanzen ist bis heute nicht hinreichend geklärt (AUDY et al., 1988; BOLLER, 1989; DÜRING, 1994).

Anders als in Pflanzen und Tieren übernehmen Lysozyme, die von Bakteriophagen gebildet werden, keine Abwehrfunktion. Im Entwicklungszyklus der Phagen sind Lysozyme sowohl an der Penetrationsphase als auch an der Lyse des Wirts beteiligt. So sind vermutlich Lysozyme an der lokalen Auflösung der Bakterienzellwand beteiligt und ermöglichen ein Eindringen der Phagen-DNA in die Bakterienzelle. Eine entscheidendere Rolle spielt das Lysozym jedoch am Ende der Phagen-Morphogenese. Nach dem Abschluß des Vermehrungszyklus bewirkt die enzymatische Auflösung der Bakterienzellwand die Freisetzung der infektiösen Phagenpartikel.

Das Molekulargewicht des häufig untersuchten T4-Lysozyms beträgt ca. 18 700 und das pH-Optimum liegt zwischen 7,2 und 7,4. Hühnereiweißlysozym (HEWL) hingegen besteht aus einer Kette von 129 Aminosäuren und besitzt mit 14 400 ein etwas geringeres Molekulargewicht. T4-Lysozym zeigt deutlich stärkere enzymatische Aktivität als HEWL. Es ist im Bakteriolyse-Test ca. sechsmal stärker aktiv gegen *Micrococcus luteus* (syn. *M. lysodeikticus*) und etwa 250mal stärker gegen *E. coli* als HEWL (TSUGITA, 1971).

Seit einigen Jahren wird die Wirkungsweise von Lysozymen erneut diskutiert. So konnten Pellegrini und Mitarbeiter (1992) nachweisen, daß HEWL auch ohne Zugabe von EDTA gegen Gram-negative Bakterien wirkte. Ferner blieb die bakterizide Wirkung des Lysozyms nach der Denaturierung mit Dithiothreitol erhalten. Die Autoren schließen daraus, daß das bakterizide Potential von Lysozymen auf andere Mechanismen als auf die Muramidasefunktion zurückzuführen sein muß. Schließlich zeigten sie, daß ein aus HEWL isoliertes Peptid, das nachweislich keine Enzymfunktion hatte, antimikrobielle Wirkung gegen zehn Bakterienarten besaß (PELLEGRINI et al., 1997).

Bereits McLeish und Mitarbeiter (1993) entdeckten eine Peptidsequenz in T4-Lysozym, die eine  $\alpha$ -Helix bildet. Die genauere Untersuchung des Lysozyms ergab, daß die molekulare Struktur des Proteins mehrere  $\alpha$ -Helices enthält (DÜRING et al., 1999). Vier Aminosäuresequenzen wurden von Düring genauer charakterisiert. Drei dieser Sequenzen wiesen amphipathische Charakteristika auf, wobei das Peptid  $\alpha 4$  eine perfekt geformte Helix bildet. Amphipathische Helices können durch basische Aminosäurereste Interaktionen mit sauren Membranbestandteilen eingehen und diese stark schädigen. In weiteren Untersuchungen überprüften die Autoren die Wirkung dieses Peptids auf Bakterien und stellten fest, daß es, obwohl nicht enzymatisch aktiv, ebenfalls bakterizide Wirkung hatte. Die gleiche Wirkung wurde auch für hitzedenaturiertes T4-Lysozym ermittelt. Düring und Mitarbeiter (1999) schließen

daraus, daß die antimikrobielle Wirkung, nicht wie bislang vermutet, allein auf die Muramidasefunktion des Proteins zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf die membranzerstörende Aktivität der genannten amphipathischen Helices.

### **2.2.3 Transgene Pflanzen mit Abwehrproteinen**

Seit Beginn der molekularen Pflanzenzüchtung in den achtziger Jahren liegt ein besonderer Schwerpunkt dieses neuen Arbeitsfeldes im Bereich der Resistenzforschung. Daneben werden Qualitätsfaktoren von Nutzpflanzen wie Protein-, Kohlenhydrat- und Ölgehalte, Fettsäurezusammensetzung sowie Ernte- und Verarbeitungseigenschaften bearbeitet. Weitere Bemühungen gelten der Toleranz von Pflanzen gegenüber Kälte-, Salz-, und Trockenstreß sowie der Stickstofffixierung (DESTÉFANO-BELTRÁN et al., 1991).

Bei dem Bestreben, die Resistenz von Kulturpflanzen gegenüber Schadorganismen mit molekularen Methoden zu verbessern, sind hydrolytische Enzyme wegen ihrer bekannten Rolle in den biochemischen Abwehrprozessen von Pflanzen und wegen ihrer Wirkung gegen phytopathogene Pilze von besonderem Interesse. Bis heute sind daher zahlreiche Transformationen an verschiedenen Pflanzenarten mit dem Ziel vorgenommen worden, die biochemischen Abwehrprozesse durch zusätzliche PR-Proteine zu ergänzen.

So konnten Jach und Mitarbeiter (1995) durch konstitutive Expression einer Gerstenchitinase den Befall von Tabak-Jungpflanzen mit *Rhizoctonia solani* deutlich reduzieren. Auch transgene Raps- und Tabakpflanzen, die unter Kontrolle des 35S-Promotors eine Bohnenchitinase exprimierten, zeigten gegen diesen Erreger verringerten Befall und verlangsamte Symptomentwicklung (BROGLIE et al., 1991). Die Transformation einer Rosensorte mit einem Reisgen, das für eine basische Chitinase codiert, ist ebenfalls beschrieben (MARCHANT et al., 1998). Die transgenen Rosenlinien zeigten einen bis zu 43 % verringerten Befall mit *Diplocarpon rosae*. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen der Stärke der Chitinaseexpression und dem Resistenzgrad der Pflanzenlinien nachweisen werden.

Verstärkte Resistenz gegen *Alternaria longipes* zeigte transgener Tabak mit einer Chitinase aus *Serratia marcescens* (SUSLOW et al., 1988). Die Autoren weisen jedoch darauf hin, daß mit dem Alterungsprozeß die verringerte Nekrosebildung der transgenen Pflanzen verschwand.

Anders als in den vorangegangenen Beispielen konnten Neuhaus und Mitarbeiter (1991) keine verstärkte Resistenz von transgenen *Nicotianae sylvestris* gegenüber

*Cercospora nicotianae* feststellen. Die zur Transformation verwendete Klasse I Chitinase aus Tabak konnte trotz nachweisbar hoher Konzentration im Pflanzengewebe keine Resistenz gegen diesen Pathogen vermitteln.

Parallel zu den Arbeiten mit Chitinasen sind von verschiedenen Arbeitsgruppen auch Transformationen mit  $\beta$ -1,3-Glukanasen vorgenommen worden (BEFFA & MEINS, 1996; BORKOWSKA et al., 1998; JACH et al., 1995; NEUHAUS et al., 1992; YOSHIKAWA et al., 1993). Neuhaus und Mitarbeiter (1992) führten Antisense-Transformationen mit einer vakuolären  $\beta$ -1,3-Glukanase aus Tabak an *Nicotianae sylvestris* durch. Nach Inokulation mit *Cercospora nicotianae* stellte sich heraus, daß der Befall dieser Pflanzen nicht höher lag als bei den Vergleichspflanzen, obwohl in Antisense-Pflanzen keine  $\beta$ -1,3-Glukanase induziert wurde. Die Autoren schließen daraus, daß dem Enzym bei der Abwehr von *C. nicotianae* keine entscheidende Bedeutung zukommt.

Anders als Neuhaus und Mitarbeiter (1992) konnten Yoshikawa und Mitarbeiter (1993) die Bedeutung von  $\beta$ -1,3-Glukanasen in der Pathogenabwehr nachweisen. Obwohl eine Endo-Glukanase aus Sojabohnen *in vitro* keine inhibierende Wirkung auf verschiedene Pilze zeigte, vermittelte sie, in Tabak transformiert, Resistenz gegen die Pathogene *Alternaria alternata* und *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Weiterhin zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen Resistenzwirkung und Expressionsstärke der  $\beta$ -1,3-Glukanase. Dieses Ergebnis wird von Jach und Mitarbeitern (1995) für die Wirkung einer Gerstenglukanase in Tabak bestätigt.

Jach und Mitarbeiter (1995) beschäftigten sich auch mit der Koexpression verschiedener PR-Proteine in Tabak. Wurden  $\beta$ -1,3-Glukanase und Chitinase aus Gerste in Kombination transformiert, so zeigten diese Pflanzen im Vergleich zu Pflanzen, die nur Chitinase oder nur  $\beta$ -1,3-Glukanase exprimierten, deutlich verstärkte Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani*. Entsprechende Ergebnisse wurden von Zhu und Mitarbeitern (1994) beschrieben. Die Kombination einer Reis-Chitinase mit einer Luzerne-Glukanase unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors führte zu verringertem Befall von Tabakpflanzen mit *Cercospora nicotianae*.

Darüber hinaus konnten Jongedijk und Mitarbeiter (1995) die aus *in vitro*-Versuchen bekannte synergistische Wirkung von Chitinase und  $\beta$ -1,3-Glukanase in transgenen Tomaten bestätigen. Die Kombination von Chitinase und  $\beta$ -1,3-Glukanase aus Tabak führte zu deutlich verringertem Befall mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Tomatenpflanzen, die nur eines der beiden PR-Proteine exprimierten, zeigten hingegen keine Resistenz nach Inokulation mit dem Erreger.

Der Schwerpunkt der molekularen Arbeiten zur resistenzvermittelnden Wirkung von PR-Proteinen lag bislang auf Untersuchungen mit den Proteinen Glukanase und

Chitinase. Aber auch mit Proteinen der anderen PR-Gruppen wurden erfolgreiche Transformationen durchgeführt. So haben Liu und Mitarbeiter (1994) Osmotin in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen exprimiert und einen verringerten Befall von *P. infestans* festgestellt. Tabakpflanzen jedoch, die das gleiche Konstrukt trugen, wiesen keine verbesserte Resistenz gegenüber *P. parasitica* var. *nicotianae* auf. Dagegen waren transgene Tabakpflanzen, die das PR-Protein 1a exprimierten, nach Infektion mit *Peronospora tabacina* und *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* deutlich weniger befallen als die nicht transgenen Vergleichspflanzen (ALEXANDER et al., 1993).

Diese Übersicht über die bislang durchgeführten Transformationen mit den verschiedenen PR-Proteinen zeigt, daß die Anwesenheit zusätzlicher Abwehrproteine allein nicht immer ausreicht, um die jeweilige Pflanzenart in der Resistenz gegen ein bestimmtes Pathogen zu unterstützen. Zu diesem Ergebnis kommen auch Punja und Raharjo (1996). Sie transformierten drei Chitinasen aus Petunie, Tabak und Bohne in eine Gurkensorte und zwei Karottensorten. Keine der transgenen Gurken zeigte gesteigerte Resistenz gegen vier ausgewählte Pathogene. Transgene Karotten hingegen, die eine basische Tabak-Chitinase exprimierten, wiesen signifikant geringeren Befall mit drei von fünf pilzlichen Erregern auf. Interessanterweise vermittelte diese Chitinase Resistenz gegen *B. cinerea* und *R. solani* in Karotten, nicht jedoch in Gurken. Daraus folgt, daß der Erfolg der Resistenzvermittlung nicht nur von der Herkunft und Spezifität des Abwehrproteins sowie dem verwendeten Pathogen abhängt, sondern auch von der Natur der Empfängerpflanze (PUNJA & RAHARJO, 1996; SALMERON & VERNOOIJ, 1998).

Neben Transformationen mit PR-Proteinen wurden auch eine Reihe von Pflanzenarten mit verschiedenen resistenzvermittelnden Proteinen wie z.B. Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP) oder mit Lysozymen durchgeführt (SHEWRY & LUCAS, 1997). So konnten Logemann und Mitarbeiter (1992) ein RIP aus Gerstenkörnern unter der Kontrolle des *wun1*-Promotors erfolgreich in Tabak exprimieren. Transgene Tabaksämlinge, die in *Rhizoctonia solani* inokulierter Erde wuchsen, wurden durch die Auflaufkrankheit weniger geschädigt als nicht transgene Kontrollpflanzen. Das gleiche RIP unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors vermittelte ebenfalls signifikant verstärkte Resistenz gegen *R. solani* und führte zu deutlich verbesserten Auflaufraten der Tabaksämlinge in inokulierter Erde (JACH et al., 1995). Darüber hinaus zeigten Tabakpflanzen, die Chitinase und RIP aus Gerste koexprimierten, wesentlich verstärkte Resistenz gegen den Pathogen.

Im Vergleich zur Zahl molekularbiologischer Arbeiten, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, die Resistenz von Pflanzen gegen phytopathogene Pilze zu verbessern,

beschäftigen sich verhältnismäßig wenig Projekte mit der Steigerung der Resistenz gegen bakterielle Erreger. Da die sehr verbreiteten Lysozyme sowohl von Pflanzen als auch von Tieren im Abwehrprozeß gegen Bakterien gebildet werden, war die Verwendung dieser Proteine zur Transformation in Pflanzen besonders naheliegend. Trudel und Mitarbeiter (1992) berichten als erste über die erfolgreiche Transformation von Hühnereiweißlysozym (HEWL) in Tabak. Sie untersuchten die Pflanzen jedoch nicht auf mögliche Resistenzen gegenüber bakteriellen Erregern. Nakajima und Mitarbeiter (1997) transformierten Humanlysozym in Tabak und führten Befallstest mit *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* und *Erysiphe cichoracearum* durch. Blätter der transgenen Pflanzen waren sowohl gegen Bakterienbefall als auch gegen den Befall mit Mehltau weniger anfällig als nicht transgene Vergleichspflanzen. Eine Erklärung für die mögliche Wirkungsweise des HEWL gegen den pilzlichen Erreger geben die Autoren jedoch nicht.

Mit dem Ziel, die Resistenz gegen phytopathogene Bakterien zu steigern, transformierten Düring und Mitarbeiter (1993) T4-Lysozym in Kartoffelpflanzen. Mit Hilfe des 35S-Promotors und des  $\alpha$ -Amylase Signalpeptids aus Gerste konnte das Lysozym erfolgreich konstitutiv und extrazellulär exprimiert werden. Zur Überprüfung der Anfälligkeit der transgenen Pflanzen wurden zwei unterschiedliche Tests durchgeführt. Im Knollenscheibentest wiesen mit *Erwinia carotovora atroseptica* inokulierte Lysozym-Knollen deutlich weniger Mazeration auf als nicht transgene Knollen. Außerdem konnte mit einem Sproßtest gezeigt werden, daß transgene Kartoffelpflanzen die Infektion mit dem Bakterium überlebten und gesunde Sprosse bildeten, während die Kontrollpflanzen fast vollständig abstarben.

Die Verwendung von Lysozymen zur Ergänzung des pflanzlichen Abwehrsystems scheint daher ein erfolgversprechendes Verfahren zu sein, die quantitative Resistenz von Kulturpflanzen gegenüber bakteriellen Erregern zu erhöhen. Die anzunehmende Ungefährlichkeit der Lysozyme für Warmblüter machen diese Proteine darüber hinaus zu interessanten Kandidaten für die Transformation von Nahrungspflanzen (DÜRING, 1993; DÜRING et al., 1999).

## 2.3 Aufgabenstellung

Diese Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit den Möglichkeiten und Zielen der molekularen Resistenzzüchtung von Pflanzen gegenüber Pilzen.

Seit einigen Jahren werden in der Arbeitsgruppe von Dr. G. Jach am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln erfolgreich natürliche Abwehrproteine, die aus

verschiedenen Pflanzen und Bakterien stammen, in Tabak- und Kartoffelpflanzen transformiert. So konnte die resistenzvermittelnde Wirkung der aus Gerste stammenden PR-Proteine  $\beta$ -1,3-Glukanase und Chitinase sowie des Ribosomen-inaktivierenden Proteins (RIP) in transgenem Tabak gegenüber dem Bodenpathogen *Rhizoctonia solani* bereits nachgewiesen werden (LOGEMANN et al., 1992; JACH et al., 1995). Zur weiteren Erhöhung des Resistenzniveaus dieser Pflanzen wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden zur verbesserten und gezielten Expression des RIP überprüft.

Jach und Mitarbeiter (1995) konnten auch verbesserte Resistenz von Pflanzen nachweisen, die  $\beta$ -1,3-Glukanase und Chitinase bzw. RIP und Chitinase koexprimierten. Dieser vielversprechende Ansatz wurde weiterverfolgt, um neue Kombinationen von Abwehrproteinen in Tabak- und Kartoffelpflanzen zu transformieren. Die phytopathologischen Untersuchungen zur Überprüfung der Resistenzniveaus dieser transgenen Pflanzenlinien sind in dieser Arbeit auf kulturspezifische Blattpathogene ausgedehnt worden.

Auf der Suche nach wirkungsvollen Resistenzmechanismen zum Schutz von Kartoffelpflanzen gegenüber phytopathogenen Bakterien untersuchten Düring und Mitarbeiter (1993 und 1999) die Aktivität von T4-Lysozym auf bakterielle Erreger *in vitro* und in transgenen Kartoffelpflanzen. Die hohe Wirksamkeit des Lysozyms gegen Bakterien und die deutlich verringerte Befallbarkeit von Kartoffelknollen nach Inokulation mit *Erwinia carotovora* ssp. machen das Protein zu einem hoffnungsvollen Resistenzfaktor für die Pflanzenzüchtung. Da die antimikrobielle Aktivität des Lysozyms nicht mehr ausschließlich auf Enzymfunktionen zurückgeführt wird (DÜRING et al., 1999; PELLEGRINI et al., 1992), eröffneten sich Fragen zur Wirksamkeit gegen andere landwirtschaftlich wichtige Krankheitserreger. Daher sollten neben Untersuchungen zur Wirkung von Lysozymen auf Keimung und Wachstum von phytopathogenen Pilzen auch transgene T4-Lysozym-Kartoffeln auf ihr Verhalten nach Infektion mit verschiedenen Blattpathogenen überprüft werden. Weiterhin sollten mögliche resistenzvermittelnde Effekte in transgenen Kartoffeln und mögliche Wirkmechanismen gegen Pilze *in vitro* untersucht werden.

Transgene Pflanzen unterliegen bis heute in der Bundesrepublik Deutschland besonderen Sicherheitsmaßnahmen. So ist der Anbau solcher Pflanzen nur in Gewächshäusern der Sicherheitsstufe S1 möglich. Die Freisetzung von transgenen Pflanzen ist nur nach Genehmigung eines umfangreichen Freisetzungsverfahrens erlaubt und zudem zeit- und kostenaufwendig. Ferner ist das zur Verfügung stehende

Vermehrungsmaterial transgener Pflanzen insbesondere von Kartoffeln in der frühen Forschungsphase oft begrenzt. Phytopathologische Untersuchungen, die die molekulare Pflanzenzüchtung begleiten, müssen sich diesen schwierigen Bedingungen anpassen. Ein von Gieffers (FLADUNG & GIEFFERS, 1993; GIEFFERS & FLADUNG, 1999) für *in vitro*-Befallstests entwickeltes Testverfahren, bei dem Blattscheiben in Bewässerungsboxen inkubiert werden, sollte als Grundlage für Resistenztests mit den verschiedenen Pflanzenlinien dienen und auf die besonderen Anforderungen der Testung transgener Pflanzen angepaßt werden. Dieses Testverfahren schien geeignet, mit verhältnismäßig geringer Pflanzenzahl und ohne die Zerstörung der ganzen Pflanze im frühen Entwicklungsstadium, transgene Linien hinsichtlich ihres Resistenzniveaus mit nicht-transgenen Pflanzen zu vergleichen. Neben den entsprechenden Modifikationen, die durch die Verwendung neuer Wirt-Pathogen-Systeme notwendig wurden, mußten neue Kultivierungs- und Sporulationsmethoden für diese Erreger erarbeitet werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Geräte**

- Autoklav, Tuttnauer 2540 EL, Systec Labor-Systemtechnik
- Biofuge, Heraeus-Instruments, Hanau
- Bohr- und Fräsgerät, Minimot 40, Proxxon, Niersbach/Eifel
- Brutschrank BD 53, WTB-Binder, Tuttlingen
- Kühlbrutschrank 3001, Rumed, Laatzen
- Kühlbrutschrank KLT/ S4, Ehret, Emmendingen
- Mikroskop Axiophot 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- pH-Meter, pH 325, WTW, Weilheim
- Photomakroskop, M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz
- Pipetten, Eppendorf, Hamburg
- Schüttelgerät, Reax 2000, Heidolph
- Sterilbank, Uniflow 1200 UV
- Thermomagnetrührer, IKA Labortechnik, Staufen
- Ultra-Turrax, IKA Labortechnik, Staufen
- Waagen, Sartorius AG, Göttingen
- Wasserbad, Memmert, Schwabach

#### **3.2 Materialien**

##### **Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien folgender Firmen verwendet:

- Boehringer Mannheim GmbH (Roche Diagnostics GmbH), Mannheim
- Difco Laboratories, Detroit, USA
- Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Merck KG, Darmstadt
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

##### **Peptide**

Die Peptide A4 und A23 sind Bestandteile des T4-Lysozyms und wurden synthetisch hergestellt von Genosys Biotechnologies Inc., Cambridge, England.



Peptid A4

- Sequenz: PNRKRVITTFRT (Pro Asn Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr)
- Molekulargewicht 1559,853

Peptid A23

- WDEAAVNLAWSRWYNQ (Trp Asp Glu Ala Ala Val Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp Tyr Asn Gln)
- Molekulargewicht 1951,148

**3.3 Pathogenisolate****Tab. 1: Isolatbezeichnungen und Herkünfte der verwendeten pilzlichen Pathogene**

| Pathogen                       | Isolat   | Herkunft  |
|--------------------------------|----------|---|
| <i>Alternaria solani</i>       | A.s.1    | Stamm 62028 der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig  |
| <i>Botrytis cinerea</i>        | B39, B42 | Isoliert von Tabak bzw. Kartoffel, Köln 1996  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>      | F.o.3    | Stamm 2018 der DSMZ, Braunschweig   |
| <i>Phytophthora infestans</i>  | P.i.1-11 | Enthält die Virulenzgene 1 bis 11 und stammt vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln; Abt. Hahlbrock                       |
| <i>Phytophthora nicotianae</i> | P.n.1    | Stamm 62704 der DSMZ, Braunschweig  |
| <i>Phytophthora nicotianae</i> | P.n.4    | Rasse 0, wurde freundlicherweise von Dr. S.B. Slavov, Institute for Genetic Engineering, Kostinbrod, Bulgarien, zur Verfügung gestellt. |
| <i>Verticillium</i> ssp.       | V13      | Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn  |

### 3.4 Nährmedien und Puffer

#### Pflanzen-Medium

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| 4,3 g   | MS Basal Salt Mixture (Sigma)      |
| 30 g    | Saccharose                         |
| 15 g    | Agar                               |
| 100 mg  | Kanamycin                          |
| 1000 ml | H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> |
|         | pH 5,8                             |

#### Hafer-Agar

|         |  |
|---------|--|
| 30 g    | Haferflocken   |
| 15 g    | Agar   |
| 1000 ml | H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>                                       |
|         | Haferflocken in Wasser zwei Stunden kochen, filtrieren und autoklavieren |

#### *Phytophthora nicotianae* Medium

|        |   |
|--------|---|
| 8 g    | Lima-Bean-Agar (Difco)  |
| 1 g    | CaCO <sub>3</sub>   |
| 3 g    | KNO <sub>3</sub>  |
| 300 ml | Haferschleim (15 g Haferflocken in 300 ml H <sub>2</sub> O, 2 h kochen) |
| 13 g   | Bacto-Agar (Difco)  |
| 50 mg  | Chloramphenicol   |
| 620 ml | H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>                                      |
| 80 ml  | Gemüsesaft (Fa. Krings)   |
|        | Gemüsesaft nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C dazugeben  |

#### Gemüsesaft-Agar

|        |  |
|--------|--|
| 200 ml | Gemüsesaft (Fa. Krings)  |
| 3 g    | CaCO <sub>3</sub>  |
| 15 g   | Agar   |
| 800 ml | H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>                                       |
|        | Gemüsesaft nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C hinzugeben. |

Alternaria-Flüssigmedium

|        |   |
|--------|---|
| 2 g    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                 |
| 2 g    | CaCO <sub>3</sub>   |
| 1 g    | KNO <sub>3</sub>  |
| 1 g    | Glukose   |
| 1 g    | Saccharose  |
| 1 g    | Hefe-Extrakt  |
| 0,3 g  | L-Asparagin   |
| 50 ppm | Chloramphenicol   |
| 840 ml | H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>                              |
| 160 ml | Gemüsesaft (Fa. Krings, nach Abkühlen auf ca. 50 °C hinzugeben) |

A1-Puffer (nach Woloshuk et al., 1991)

|       |                                 |
|-------|---------------------------------|
| 15 mM | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 20 mM | NaCl                            |
|       | pH 6,4                          |

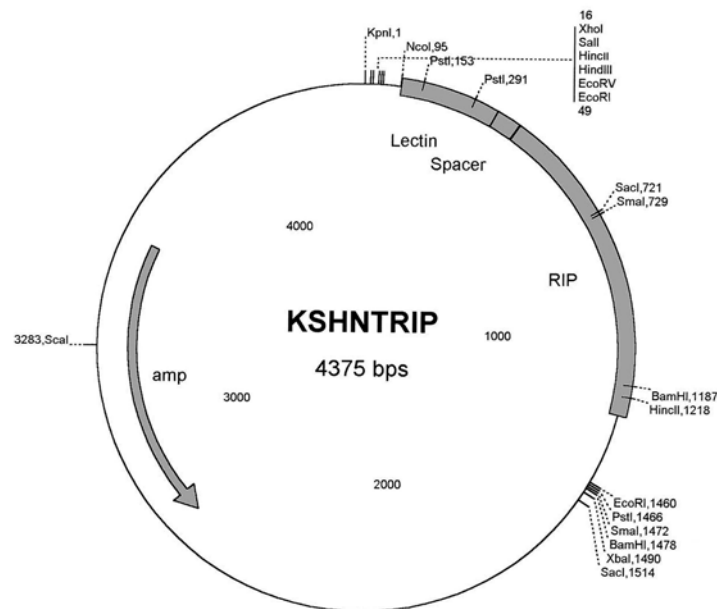
**3.5 Pflanzenmaterial****3.5.1 Kartoffelsorten**

|          |  |
|----------|--|
| Désirée: | Speisesorte, frühe Reifegruppe, W. Lange, Bad Schwartau  |
| Panda:   | Wirtschaftssorte, mittelspäte bis sehr späte Reifegruppe, Uniplanta Saatzeit<br>KG, Brunnen              |
| Secura:  | Speisesorte, mittelfrühe Reifegruppe, KWS, Einbeck<br>(Beschreibende Sortenliste, BUNDESSORTENAMT, 1998) |

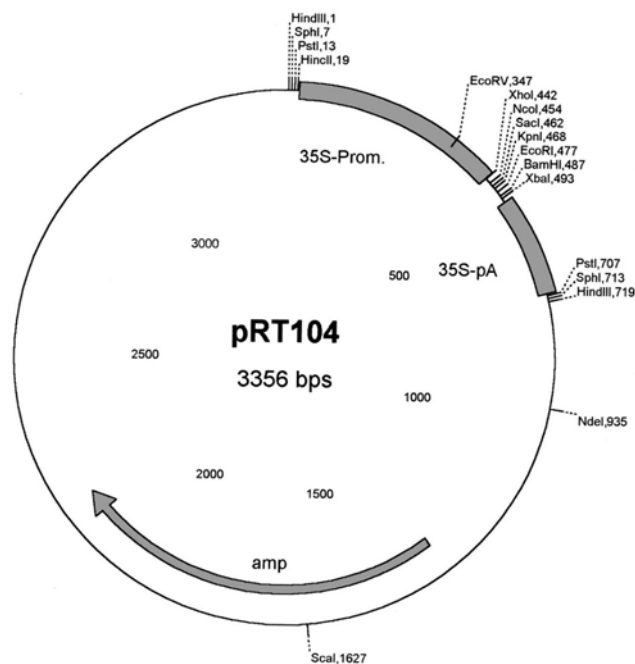
**3.5.2 Glukanase und RIP exprimierende Tabaklinien**

Die transgenen Tabaklinien 28 und 34 wurden von der Arbeitsgruppe Dr. G. Jach am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung hergestellt. Die Linie 28 exprimiert das Gen für ein Ribosomen-inaktivierendes Protein aus Gerste unter Kontrolle des 35S-Promotors. Die Linie 34 exprimiert das Chitinase-A-Gen aus *Serratia marcescens* ebenfalls unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Beide Konstrukte werden bei Jach und Mitarbeitern (1995) beschrieben. Zur Transformation von Lectin-RIP in SR1-Tabak wurden die Plasmide KSHNTRIP und pRT104 (TÖPFER et al., 1987) verwendet. Das Plasmid KSHNTRIP (Abb. 1) enthält das

Ribosomen-inaktivierende Protein mit dem Lectin-Spacer, während das Plasmid pRT104 (Abb. 2) den 35S-Promotor enthält. Das Lectin-RIP-Insert wurde mit dem pRT104 ligiert und das fertige Promotor-RIP-Konstrukt zur Transformation in den binären Vektor pBIN19 (DATLA et al., 1992) umkloniert. Die Transformation von SR1-Tabak erfolgte wie bei Hoekema und Mitarbeitern (1983) beschrieben.



**Abb. 1:** Restriktionskarte des Plasmids KSHNTRIP mit dem RIP-Gen und dem Lectin-Spacer. Amp: Ampicillinresistenzgen  $\beta$ -Lactamase.



**Abb. 2:** Restriktionskarte des Plasmids pRT104 (TÖPFER et al., 1987) mit dem konstitutiven 35S-Promotor und dem 35S-pA Signalpeptid. Amp: Ampicillinresistenzgen  $\beta$ -Lactamase. Das Plasmid wurde mit den Enzymen NcoI und EcoRI geschnitten.

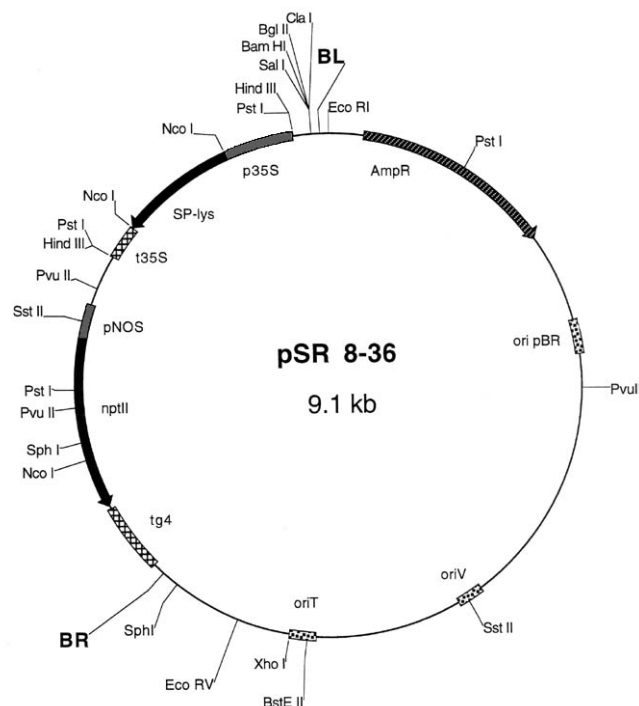
### 3.5.3 Glukanase, Chitinase und RIP exprimierende Kartoffellinien

Die transgenen Glukanase, Chitinase und RIP exprimierende Kartoffellinien wurden von der Arbeitsgruppe Dr. G. Jach am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung hergestellt. Die Konstrukte, die für die Transformation dieser Pflanzen verwendet wurden, sind bei Jach und Mitarbeitern (1995) beschrieben.

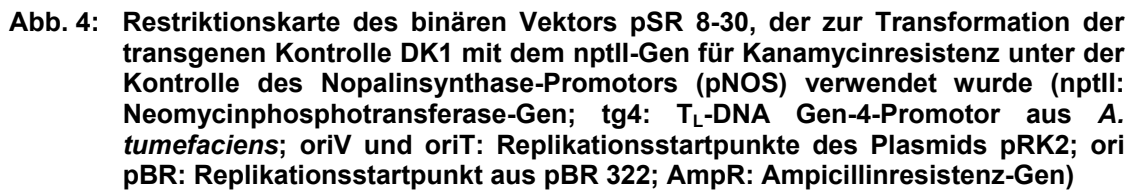
### 3.5.4 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorten Désirée und Panda

Die Kartoffellinien der Sorten Désirée, Panda und Secura wurden von Herrn Dr. Klaus Düring vom Institut für Züchtungsmethodik bei Gemüse der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Quedlinburg bereitgestellt.

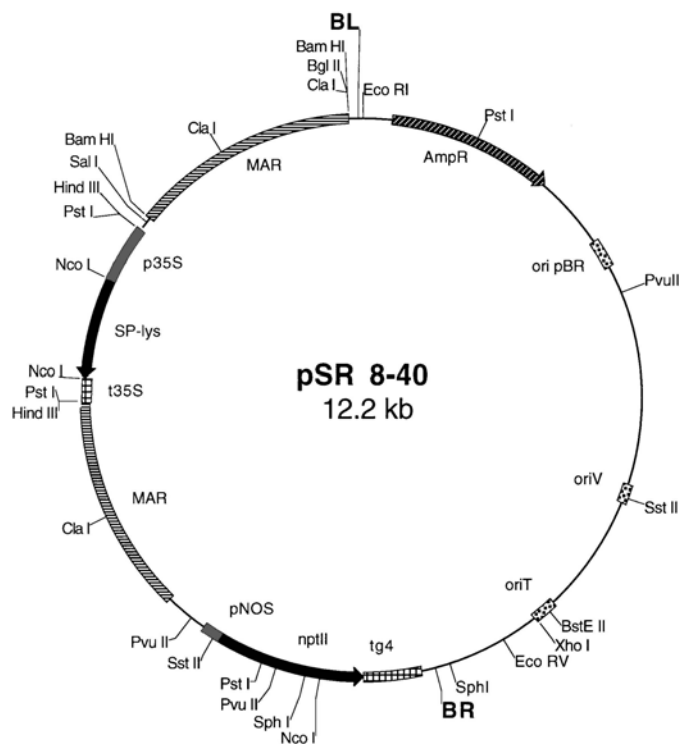
Die transgenen Linien DL1, DL2 und DL3 mit der Ausgangssorte Panda sowie die Linien DL4 und DL5 mit der Ausgangssorte Désirée wurden mit dem binären Vektor pSR 8-36 (Abb. 3) transformiert. Dieser enthält das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors aus Cauliflower Mosaic Virus (CaMV).



**Abb. 3:** Restriktionskarte des binären Vektors pSR 8-36, der zur Transformation der Sorten Désirée und Panda mit dem T4-Lysozym-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors (p35S) verwendet wurde (t35S: CaMV 35S-Terminator; SP-lys: Gerste  $\alpha$ -Amylase-Signalpeptid mit T4-Lysozym-Gen; pNOS: Nopalinsynthase-Promotor; nptII: Neomycinphosphotransferase-Gen; tg4: TL-DNA Gen-4-Promotor aus *A. tumefaciens*; oriV und oriT: Replikationsstartpunkte des Plasmids pRK2; ori pBR: Replikationsstartpunkt aus pBR 322; AmpR: Ampicillinresistenz-Gen).



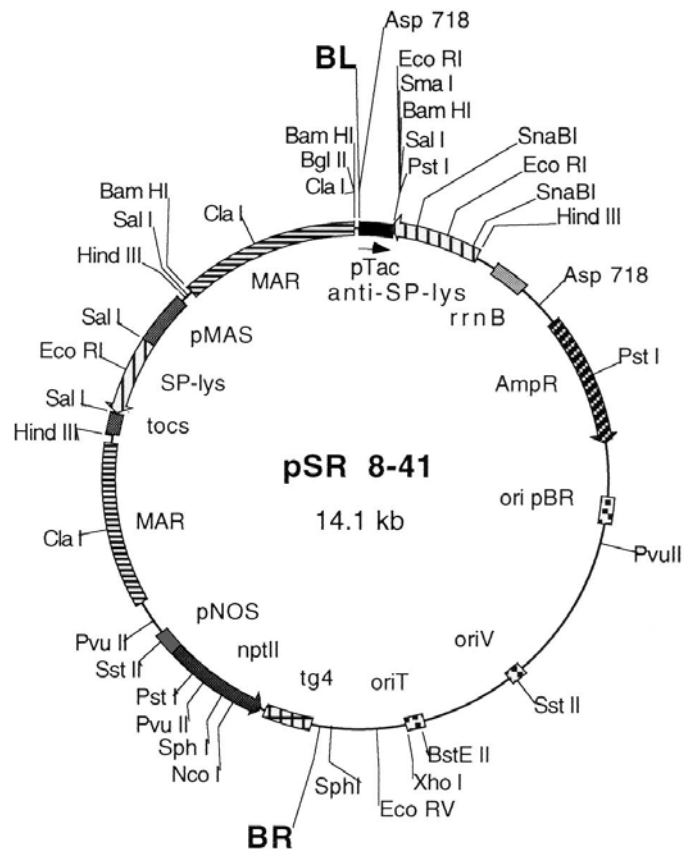
Der binäre Vektor pSR 8-40 (Abb. 5) enthält wie der pSR 8-36-Vektor das SP-Lysozymgen unter Kontrolle des 35S-Promotors und das nptII-Gen für Kanamycinresistenz. Zusätzlich wird die T4-Lysozym-35S-Promotor-Sequenz von zwei MAR-Regionen (matrix associated regions) aus Sojabohne flankiert (BREYNE et al., 1992; PORSCHE et al., 1998). Dieser Vektor wurde für die Transformationen der Linien 201/5, 202/11 und 208/5 der Kartoffelsorte Secura sowie für die Linien DL10 bis DL14 der Sorte Désirée verwendet.



**Abb. 5:** Restriktionskarte des binären Vektors pSR 8-40, der zur Transformation der Sorten Secura und Désirée mit dem T4-Lysozym-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors (p35S) verwendet wurde (MAR: matrix associated region; t35S: CaMV 35S-Terminator; SP-lys: Gerste  $\alpha$ -Amylase-Signalpeptid mit T4-Lysozym-Gen; pNOS: Nopalinsynthase-Promotor; nptII: Neomycinphosphotransferase-Gen; tg4: T<sub>L</sub>-DNA Gen-4-Promotor aus *A. tumefaciens*; oriV und oriT: Replikationsstartpunkte des Plasmids pRK2; ori pBR: Replikationsstartpunkt aus pBR 322; AmpR: Ampicillinresistenz-Gen).

### 3.5.6 Lysozym exprimierende Kartoffellinien mit Mannopinsynthase-Promotor

Die transgenen 8-41-Linien der Kartoffelsorte Désirée exprimieren das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des wund- und hormoninduzierbaren Mannopinsynthase-Promotor (pMAS) aus *Agrobacterium tumefaciens* (FELTKAMP et al., 1995; LANGRIDGE et al., 1989, SANGER et al., 1990). Zur Transformation dieser Linien wurde der binäre Vektor pSR 8-41 (Abb. 6) verwendet. Neben dem Kanamycinresistenz vermittelnden nptII-Gen enthält das Plasmid ebenfalls MAR-Regionen aus Sojabohne, die die SP-Lysozym-Promotor-Sequenz flankieren.



**Abb. 6:** Restriktionskarte des binären Vektors pSR 8-41, der zur Transformation der 8-41-Linien (aus Désirée) mit dem T4-Lysozym-Gen unter der Kontrolle des Mannopinsynthese-Promotors (pMAS) verwendet wurde (BL: linke T-DNA border; BR: rechte T-DNA border; MAR: matrix associated region aus *Glycine max*; pMAS: Mannopinsynthese-Promotor; SP-lys: Gerste  $\alpha$ -Amylase-Signalpeptid mit T4-Lysozym-Gen; tocs: Terminator des Octopinsynthese-Gens aus *A. tumefaciens*; pNOS: Nopalinsynthese-Promotor; nptII: Neomycinphosphotransferase-Gen; tg4: T<sub>L</sub>-DNA Gen-4-Promotor aus *A. tumefaciens*; oriV und oriT: Replikationsstartpunkte des Plasmids pRK2; ori pBR: Replikationsstartpunkt aus pBR 322; AmpR: Ampicillinresistenz-Gen; rrnB: bakterieller Terminator; anti-SP-lys: antisense SP-lys-Gen; pTac: bakterieller TAC-Promotor)

### 3.6 Pflanzenanzucht

#### 3.6.1 Tabakpflanzen

Resistenzuntersuchungen an transgenem Tabak wurden mit Pflanzen der T1-Generation durchgeführt. Die Selektion dieser Pflanzen erfolgte mit Hilfe des Markergens auf Kanamycin-haltigem Nährmedium. Dazu wurden die Samen zunächst durch Übergießen mit 70prozentigem Ethanol (ca. 2 Minuten) und anschließend dreimaligen Waschen in sterilem Wasser oberflächlich sterilisiert. Die Samen wurden dann auf dem in Kapitel 3.4



angegebenen Pflanzenmedium in Petrischalen ausgelegt. Die Nährböden für die transgenen Linien enthielten zusätzlich 100 mg / l Kanamycin. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Thermo-Lichtschrank bei 25 °C und Wechsellicht. Alle Samen bildeten zunächst Keimblätter. Nach einigen Tagen unterschieden sich die Pflanzen mit Kanamycinresistenz jedoch deutlich von den nicht-resistenten Pflanzen. Resistente Sämlinge bildeten rasch Wurzeln und Primärblätter. Bei nicht-resistenten Pflanzen hingegen ging das Wachstum nicht über das Keimblattstadium hinaus (Abb. 7). Nach etwa 14 Tagen zeigten diese Sämlinge zusätzlich eine vollständige Entfärbung der Keimblätter.

Nach der Bildung des ersten Laubblattes erfolgte das Umsetzen der selektierten Pflanzen von den Petrischalen in größere Gläser. Hatten die Pflanzen etwa eine Größe von 5 cm erreicht und ausreichend Wurzeln gebildet, wurden zehn Pflanzen jeder Linie ins Gewächshaus überführt und in Einheitserde ED73 ausgepflanzt. Dazu wurden zunächst 10-cm-Töpfe und nach dem Umtopfen 15-cm-Töpfe verwendet. Da die Einheitserde mit einem Langzeitdünger versetzt war, war eine Zusatzdüngung mit einem Volldünger erst nach einigen Wochen notwendig.

Die Kultivierung im Gewächshaus erfolgte unter üblichen Bedingungen. Die Temperatur lag durchschnittlich bei etwa 20 bis 25 °C. In den Wintermonaten wurden die Pflanzen 4-5 Stunden täglich mit Zusatzlicht versorgt.



**Abb. 7:** Tabaksämlinge auf Kanamycin-haltigem Selektionsmedium; Pflanzen mit Kanamycinresistenz (nptII-Gen) entwickeln Laubblätter, während nicht-resistente Pflanzen nur bis zum Keimblattstadium wachsen.

Für die Befallstests mit den verschiedenen Erregern wurden ausschließlich Pflanzen verwendet, die ohne Pflanzenschutzmaßnahmen (insbesondere Fungizide) herangezogen worden waren. Trat in den Wintermonaten Mehltaubefall (*Erysiphe cichoracearum*) auf, wurden die Pflanzen verworfen. Insektizidmaßnahmen waren in der Regel nicht notwendig. Ein geringer Befall der Weißen Gewächshausfliege (*Trialeurodes vaporariorum*) war nur vereinzelt bei älteren Pflanzen zu beobachten.

Die Blattentnahme für Befallstests erfolgte etwa ab dem Stadium, in dem die Pflanzen eine Größe von 25 cm erreicht hatten. Von jeder Pflanze wurde nur ein Blatt der gleichen Blattetage und der gleichen Größe entnommen, aus dem dann 4-8 Blattscheiben gestanzt wurden. Mit dem Beginn der Blütenbildung endeten die Befallsuntersuchungen an Tabak.

### **3.6.2 Kartoffelpflanzen**

Neben Tabak wurden auch transgene Kartoffeln für Resistenzuntersuchungen verwendet. Dazu wurden in der Regel je Linie zehn Pflanzen aus Knollen herangezogen. Gut vorgekeimte Knollen wurden dazu in ein Gemisch aus 1/3 Sand und 2/3 Komposterde in 15-cm-Töpfe ausgepflanzt. Zur Nährstoffversorgung wurde ein Langzeitdünger unter die Erde gemischt.

In den Sommermonaten wurden die Pflanzen ausschließlich in klimatisierten Gewächshausabteilen angebaut. Die Temperaturen in diesen Abteilen betrug durchschnittlich 17-19 °C. Selbst an sehr heißen Sommertagen lag die Temperatur aufgrund der Kühlung mindestens 5 °C unter der Außentemperatur. Unter diesen Bedingungen ließen sich sehr kräftige Pflanzen heranziehen, die zudem nur sehr selten unter Insekten- bzw. Pilzbefall litten. Pflanzenschutzmaßnahmen waren daher nicht erforderlich. Der Anbau in den Wintermonaten erfolgte unter Einsatz von täglich fünf Stunden Zusatzlicht.

Für Untersuchungen mit der Linie 8-41 wurden in einigen Fällen zur schnellen Vermehrung Pflanzen über Stecklinge herangezogen. Diese wurden dann unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die aus Knollen herangezogenen Pflanzen.

Die Blattentnahme für Resistenzuntersuchungen an Kartoffeln erfolgte frühestens in einem Stadium, in dem vier Blätter voll entwickelt waren. Von allen Pflanzen wurden ausschließlich Blätter der gleichen Blattetage verwendet. Dabei wurde von jeder Pflanze jeweils nur ein vollständiges Fiederblatt entnommen. Zusätzlich mußten diese Blätter etwa gleich groß und frei von Verletzungen oder Vergilbungen sein. Mit dem Beginn der Blüte endete die Probennahme an den Testpflanzen.

### 3.7 Erhaltung, Sporulation und Inokulation der Erreger

#### 3.7.1 *Phytophthora infestans*

Als fakultativ biotropher Pilz kann *P. infestans* zwar auf künstlichen Nährmedien erhalten werden, eine längere Kultivierung *in vitro* ist jedoch häufig mit einem Rückgang an Virulenz und Pathogenität verbunden. Aus diesem Grund wurde der Erreger ausschließlich auf frischem Blattmaterial der Kartoffelsorte Désirée in Bewässerungsboxen erhalten. Durch wöchentliches Inokulieren von Blattscheiben mit einer Sporangiensuspension, die von bereits sporulierenden Blattstücken gewonnen wurde, konnte sichergestellt werden, daß stets ausreichend Infektionsmaterial für Befallstests zur Verfügung stand. Die Inkubation hierfür erfolgte im Thermo-Lichtschrank bei einer Dauertemperatur von 10 °C. Der Befallsverlauf war bei dieser niedrigen Temperatur zwar verhältnismäßig langsam, die gebildeten Sporangien waren so jedoch mehrere Tage verwendbar.

Als Inokulum für Resistenztests wurden Sporangiensuspensionen verwendet, die durch Abspülen sporulierender Blattscheiben mit Leitungswasser hergestellt wurden. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 200 Sporangien je 20 µl ( $10^4$  Sporangien / ml) eingestellt und in einem offenen Becherglas für 20 bis 30 Minuten im Kühlschrank auf 4 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Inokulation durch Aufsetzen eines 20 µl Tropfens auf die mit den Unterseiten nach oben ausgelegten Blattscheiben. Die Kältebehandlung bewirkte, daß innerhalb der folgenden 2-3 Stunden Zoosporen aus den Sporangien schlüpften.

Für Resistenztests mit *P. infestans* betrug die Inkubationstemperatur 17 °C / 10 °C mit einer Licht- bzw. Temperatur-Periode von 8/16 Stunden. Eine erste quantitative Befallsbestimmung der inokulierten Blattscheiben konnte unter diesen Bedingungen in der Regel nach 5-6 Tagen durchgeführt werden.

#### 3.7.2 *Phytophthora nicotianae*

Zur Kultivierung von *Phytophthora nicotianae* wurde ein in Kapitel 3.4 beschriebenes neues Nährmedium entwickelt, das ein besonders starkes Myzelwachstum gewährleistete. Da Gemüsesaft ein wichtiger Bestandteil des Mediums ist, konnte dieser Nährboden nicht gelagert werden, sondern mußte regelmäßig vor Gebrauch neu hergestellt werden.

*P. nicotianae* wurde auf diesen *Phytophthora*-Agar überimpft und bei Raumtemperatur kultiviert. Nach etwa zehn Tagen wurde das oberflächliche Myzel vorsichtig mit einem Skalpell vom Nährmedium abgezogen, in eine Petrischale überführt und mit einigen Millilitern einer 0,01 M KNO<sub>3</sub>-Lösung übergossen (GOODING & LUCAS, 1959). Durch Schwenken der

Petrischale konnte das Myzel gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt werden. Nach drei bis fünf Tagen waren große Mengen Sporangien gebildet. Mit Hilfe eines Metallsiebes (0,5 mm Maschenweite) wurden die Sporangien mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> vom Myzel gespült. Zur Erhöhung der Sporangienkonzentration mußte die Suspension in einigen Fällen bei 3 000 upm. zentrifugiert und der Überstand abpipettiert werden.

Die Inokulation erfolgte durch Aufsetzen eines 20 µl-Tropfens der Sporangiensuspension auf die Blattunterseiten von Tabakblättern. Die Sporangienkonzentration betrug dabei 200 Sporangien je Tropfen.

In einigen Tests wurden Tabakblattscheiben mit myzelbewachsenen Agarstücken inokuliert. Dazu wurden Agarstücke mit einem 4 mm-Korkbohrer am Rand einer auf Hafer-Agar wachsenden *P. nicotianae* Kultur ausgestochen. Diese Agarblöcke wurden anschließend mit ihrer myzelbewachsenen Seite auf die Unterseiten von Tabakblattscheiben gesetzt.

Die Inkubation der Befallstests mit *P. nicotianae* erfolgten bei einer Temperatur von 20 bis 22 °C im Thermo-Lichtschrank. Das Licht/Dunkelheit-Intervall betrug 12/12 Stunden.

### **3.7.3 *Alternaria solani***

Die Erhaltung von *Alternaria solani* erfolgte auf Potato-Dextrose-Agar (Difco). Da der Erreger jedoch nicht auf gebräuchlichen Nährmedien sporuliert, mußte ein neues Verfahren zur Gewinnung von Konidien entwickelt werden. Dazu wurde *A. solani* in einem flüssigen Nährmedium bei 20 °C angezogen. Nach dreitägiger Wachstumszeit im Erlenmeyerkolben wurde das Nährmedium abgegossen und das gebildete Myzel unter sterilen Bedingungen mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Anschließend wurde eine dünne Schicht der Myzelsuspension auf Wasseragar mit einem Gehalt von 0,5 % Zellulose verteilt. Die Inkubation im Klimaschrank erfolgte unter UVA-Licht bei 17 °C. Nach etwa einer Woche waren ausreichend Konidien gebildet, um durch Abspülen der Sporen mit Wasser eine Konidiensuspension herzustellen. Nach dem Einstellen der Konidiensuspension auf 500 Konidien / 20 µl wurde ein Tropfen der Suspension mit einer Combitip-Pipette (Eppendorf) auf die Unterseiten der Kartoffelblattscheiben gesetzt. Die Inkubation der *A. solani* - Befallstests erfolgte bei einer Temperatur von 17 bis 20 °C. Die Tag/Nacht-Periode lag bei 12/12 Stunden.

### **3.7.4 *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* ssp.**

Die Erreger *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* und *Verticillium* ssp. wurden auf Potato-Dextrose-Agar (Difco) kultiviert und überdauert. Alle Pilze sporulierten zuverlässig auf diesem Medium und bildeten ausreichend Sporen für Infektions- oder *in vitro*-Tests. Die

Gewinnung der Konidien erfolgte in der Regel durch Abspülen der Sporen von der Myzeloberfläche mit sterilem Wasser. Konidien suspensionen von *B. cinerea* wurden zur Anregung der Sporenkeimung mit 0,3prozentiger Maltoselösung hergestellt.

Bei Inokulation von Tabakblattscheiben mit Konidien der zur Verfügung stehenden *B. cinerea* Isolate entwickelte sich nur geringer Befall. Im Bereich der Inokulationstropfen bildeten sich nur kleine Nekrosen, die nur eine Befallsfläche von ca. 5 % erreichten. Aus diesem Grund wurden für die Resistenztests mit transgenem Tabak 4 mm große Agarstücke, die aus den Randzonen von wachsenden Kulturen entnommen wurden, zur Inokulation verwendet. Das Aufsetzen der Agarstücke erfolgte mit der myzelbewachsenen Seite auf die Unterseiten der Blattscheiben. Diese Befallstests wurden mit 2,5 cm großen Blattscheiben und bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C durchgeführt.

### **3.8 *In vitro*-Wirkung verschiedener Lysozyme und Peptide**

#### **3.8.1 Keimschlauchlängentests mit Lysozymen und Peptiden**

Zur Überprüfung der Wirkung verschiedener Proteine und Peptide auf das Wachstum pilzlicher Erreger wurden Keimschlauchlängentests durchgeführt. Dazu wurden Konidien verschiedener Pflanzenpathogene verwendet (*F. oxysporum*, *P. nicotianae*, *B. cinerea*, *A. alternata*). In die Untersuchungen einbezogen wurden folgende Substanzen:

- T4-Lysozym (T4-Lys)
- Denaturiertes T4-Lysozym (T4 D)
- T4-Lysozym Mutante M6K (T4M)
- Peptid A4
- Peptid A23
- Hühnereiweißlysozym (HEWL)
- Denaturiertes HEWL (HEWL D)
- Rinderserumalbumin (BSA)
- Denaturiertes BSA (BSA D)

BSA und denaturiertes BSA dienten bei allen Versuchen als Proteinkontrollen. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten, waren die Stoffe in verschiedenen Pufferlösungen angesetzt. Daraus resultierten folgende Kontrollen:

- I      1 x PBS (T4-Lys, A4, T4M)
- II     PBS + DMSO (T4D)
- III    PBS/DMSO/Triton (A23)

Die Proteine HEWL, T4-Lys und BSA wurden im Wasserbad zehn Minuten bei 80 °C denaturiert. Damit die Proteine auch nach dem Denaturieren gelöst blieben, wurde den Puffern DMSO bzw. DMSO/Triton zugegeben. Ein geringer Rest der Proteine blieb ungelöst.

Die Keimschlauchlängentests wurden mit Hilfe von sterilen Lab-Tec® Chamber Slides™ der Firma Nunc durchgeführt. Dabei handelt es sich um Objektträger mit acht aufgesetzten, quadratischen Kavernen aus transparentem Kunststoff. Jede dieser Kavernen wurde mit je 500 µl Wasseragar (Leitungswasser + 1,5 % Agar, pH 6,5) gefüllt. Nach Herstellung der verschiedenen Sporensuspensionen und Zugabe des zu untersuchenden Lysozyms bzw. Peptids wurden 16 µl Suspension in jede Kaverne gegeben.

Für Tests mit *B. cinerea* und *F. oxysporum* (Isolate F.o. 3 und B 39; siehe Tab. 1) wurden zunächst sterile Konidiensuspensionen mit einer Dichte von 500 Konidien / 20 µl ( $2,5 \times 10^5$  Konidien / ml) hergestellt. Diese Suspensionen wurden für drei Minuten bei 12 000 upm. zentrifugiert und nach dem Abpipettieren des Überstandes in dem gleichen Volumen der verschiedenen Pufferlösungen bzw. Kontrollösungen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Lysozym bzw. Peptid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg / µl. Nach dem Einfüllen der Konidiensuspension in die Chamber Slides betrug die Inkubationszeit für *B. cinerea* etwa drei Tage und für *F. oxysporum* 7 Stunden bei Raumtemperatur. Jede Variante wurde in vierfacher Wiederholung angesetzt.

Weitere Keimschlauchlängentests wurden mit *P. nicotianae* durchgeführt. In Voruntersuchungen wurde festgestellt, daß nur sehr wenige Sporangien bzw. Zoosporen des Pilzes *P. infestans* auf künstlichen Nährmedien keimten. Da der Pilz zudem nur auf Blattscheiben und nicht steril kultiviert wurde, war dieser Erreger für Sporenkeimungstests auf Agar nicht geeignet. Statt dessen wurde zunächst *P. nicotianae* als Testorganismus verwendet.

Die Sporangienproduktion in 0,01 M KNO<sub>3</sub>-Lösung erfolgte wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben. Nach dem Absieben des Myzels mit einem Edelstahlnetz (Maschenweite 150 µm) und dem Auffangen der Sporangien mit einem Nylonnetz (Maschenweite 20 µm) wurden die Sporangien in A1-Puffer suspendiert und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C gekühlt. Daraufhin schlüpften die Zoosporen innerhalb der folgenden 20 Minuten bei Raumtemperatur und die Zoosporendichte konnte auf ca. 500 je 20 µl ( $2,5 \times 10^5$  je ml) eingestellt werden.

Anschließend erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Proteine bzw. Peptide bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg / µl und das Einfüllen von jeweils 16 µl in die Chamber Slides. Die Inkubationszeit betrug 20 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der spezifischen Inkubationszeiten wurden die Chamber Slides im Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurden bei 200facher Vergrößerung mit dem Objektmikrometer die Länge von jeweils 40 Keimschläuchen je Variante gemessen. Die Auswahl der gemessenen Keimschläuche erfolgte zufällig und über die gesamte Fläche einer Kammer verteilt.

Bei einem weiteren Verfahren zur Überprüfung der Wirkung von Lysozymen wurden Pilzsporen in einem stark verdünnten Puffertropfen auf einem Objektträger inkubiert. Um ein Eintrocknen der Tropfen zu verhindern, wurden die Objektträger in einer Feuchtebox gelagert. Dieses Verfahren ermöglichte neben Tests mit *B. cinerea*, *A. solani* und *F. oxysporum* auch Keimschlauchlängentests mit *P. infestans* Zoosporen, die nur in geringem Maße auf Agar keimten. Um zusätzlich die keimhemmende Wirkung des PBS-Puffers auszuschließen, wurden die zu untersuchenden Proteine in A1-Puffer (*Phytophthora*-Puffer) und in Wasser gelöst.

Sporangiensuspensionen von *P. infestans* wurden nicht-steril von sporulierenden Kartoffel-Blattscheiben hergestellt und auf eine Konzentration von 300 Sporangien je 20 µl eingestellt. Zur Anregung des Zoosporenschlupfs wurde die Suspension für 30 Minuten auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden die gewünschten Proteinkonzentrationen eingestellt und je zwei 40 µl-Tropfen auf zuvor gereinigte Objektträger aufgesetzt. Um das Eintrocknen der Tropfen zu verhindern, wurden auch die Objektträger in Feuchteboxen inkubiert. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Proteine dienten Konzentrationsreihen mit Konzentrationen zwischen 0,01 und 1,0 µg / µl. Alle Versuche wurden bei 20 bis 22 °C inkubiert und mindestens dreimal wiederholt.

### 3.8.2 Sytox-Färbetest

Zur weiteren Überprüfung der Wirkungsweise von Lysozymen bzw. Peptiden auf pilzliche Erreger wurde ein Färbetest (REED et al., 1997) durchgeführt. Dieser Test verwendet den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green Nucleic Acid Stain (S-7020; Molecular Probes). Der Farbstoff besitzt eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren, kann jedoch nicht durch funktionsfähige Membranen in lebende Zellen eindringen. Sind die Membranen jedoch geschädigt oder ist die Zelle bereits abgestorben, dringt der Farbstoff ein und färbt das Zellinnere im Fluoreszenzlicht leuchtend grün.

Für die Untersuchung fanden *F. oxysporum* und *P. infestans* als Testorganismen Verwendung. Die zu überprüfenden Substanzen waren T4-Lysozym, Hühnereiweißlysozym, das Peptid A4 sowie Rinderserumalbumin (BSA) und PBS-Puffer als Kontrollen. Da das Peptid A23 in Triton und DMSO gelöst war, konnte es wegen der membranbeeinflussenden Wirkung dieser Stoffe nicht mit in die Untersuchungen einbezogen werden.

Für den Versuch wurde folgender Ansatz verwendet:

- 32 µl Potato-Dextrose-Broth (mit 100 ppm Chloramphenicol; pH 6,5)
- 18 µl Protein- / Peptidlösung bzw. Kontrolllösung
- 10 µl Sporensuspension

Die Endkonzentration aller zu untersuchenden Stoffe betrug 3 µg / µl und die Sporendkonzentration lag bei ca. 3 000 Konidien / 20 µl für *F. oxysporum* und 100 Sporangien / 20 µl für *P. infestans*.

Nach drei Stunden Inkubation der Sporensuspensionen bei 20 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde der Farbstoff SYTOX bis zu einer Endkonzentration von 5 µM hinzupipettiert und für weitere 10 Minuten inkubiert.

Als Positivkontrolle diente eine Pufferkontrolle, die in gleicher Weise wie oben beschrieben inkubiert, jedoch anschließend für 10 Minuten mit 70prozentigem Ethanol behandelt wurde. Danach wurden die Sporen abzentrifugiert, in PDB resuspendiert und mit dem Farbstoff angefärbt.

Nach dem Anfärben mit SYTOX wurden die Proben im Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung untersucht und fotografiert. Verwendet wurde dabei das Mikroskop Axiophot 2 und der Fluoreszenzfilter 09 (450 - 490 nm) der Firma Zeiss.

### 3.9. Resistenztests

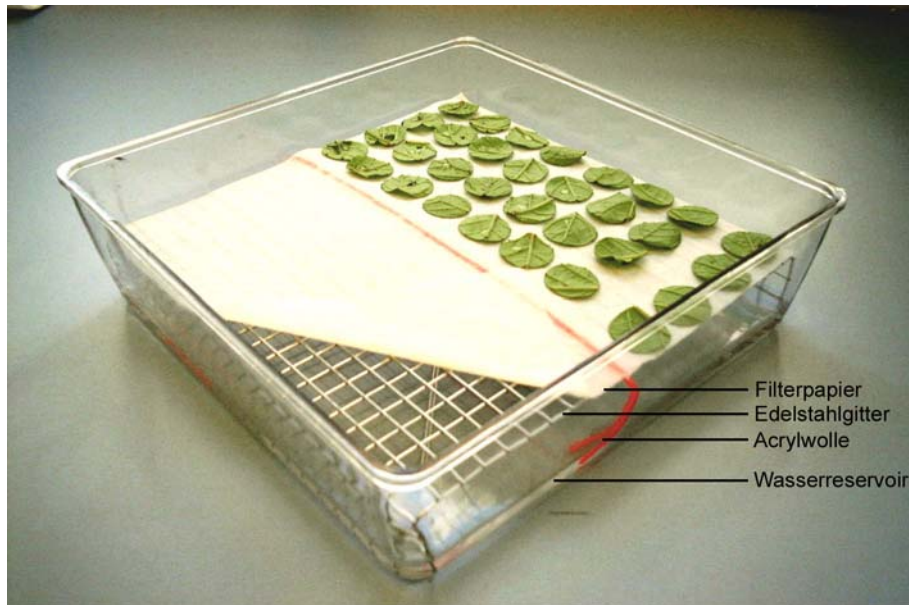
#### 3.9.1 Blattscheibentests in Bewässerungsboxen

Um die Vielzahl transgener Linien auf ihre Resistenz gegenüber unterschiedliche Erreger zu überprüfen, wurde ein **Blattscheibentest** verwendet. Die von Gieffers und Mitarbeitern (1989 und 1999) beschriebene Methodik verwendet lichtdurchlässige, stapelbare Kühlschrankdosen (Firma Hillenbrand & Bröer, Meinerzhagen) aus Kunststoff mit den Maßen 20 x 20 x 6 cm (10 x 20 x 6 oder 10 x 10 x 6 cm) zur Inkubation nach natürlicher oder künstlicher Infektion (Abb. 8).

Ein Edeltstahlgitter mit den Maßen 19 x 25 cm mit quadratischen Maschen von 1 x 1 cm wird an den kürzeren Seiten um jeweils 3 cm rechtwinkelig abgebogen, so daß beim Einsetzen in die Kunststoffschalen eine Distanz zwischen Gitter und Boden entsteht. Auf das Gitter wird ein ca. 30 cm langer, mit Wasser angefeuchteter Acrylwoolfaden gelegt, dessen Enden bis auf den Boden der Schale reichen müssen. Als Auflage für das zu untersuchende Pflanzenmaterial dient ein gut saugendes Filterpapier (Firma Schleicher & Schüll, Dassel, Nr. 520 A), das zur optimalen Flächenausnutzung auf 19,5 x 19,5 cm geschnitten wird.



Schließlich wird die Bewässerungsbox ca. 1,5 cm hoch mit Leitungswasser gefüllt, wobei gleichzeitig das Filterpapier sorgfältig angefeuchtet wird.



**Abb. 8:** Aufbau einer Bewässerungsbox zur Durchführung von Blattscheibentests

Auf dem Filterpapier entsteht ein dünner und gleichmäßiger Wasserfilm, der durch die Wassernachlieferung des Acrylfadens aus dem Reservoir permanent erhalten bleibt. Überschüssiges Wasser fließt am Gitter zurück in die Schale. Dadurch wird das auf dem Filterpapier liegende Pflanzenmaterial gleichbleibend und ausreichend mit Wasser versorgt. Gesundes Blattmaterial einiger Pflanzenarten wie Tabak, Kartoffel oder Mais konnten auf diese Weise ohne chemische Wasserzusätze für zwei bis drei Wochen erhalten werden.

Die Bewässerungsboxen werden mit einem ebenfalls lichtdurchlässigen Deckel, der einseitig mit Nocken versehen ist, verschlossen. Dadurch lässt sich die Höhe der Luftfeuchtigkeit in der Schale regulieren. Wird die Schale mit der glatten Seite des Deckels verschlossen, bildet sich aufgrund des Wasserinhalts eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit. Bei Verwendung der Nockenseite des Deckels, kommt es zu einem gleichmäßigen Luftaustausch mit der Außenluft, wodurch der Feuchtigkeitsgehalt der Luft in der Box reduziert wird.

Alle Befallsuntersuchungen mit Bewässerungsboxen fanden unter nicht-sterilen Bedingungen statt. Filterpapier, Leitungswasser und Acrylwoolfaden wurden vor der Verwendung nicht autoklaviert. Die wiederverwendbaren Schalen und Gitter wurden jedoch vor jedem Versuch autoklaviert. Das verwendete Pflanzenmaterial aus dem Freiland bzw. Gewächshaus wurde ohne oberflächliche Sterilisierung verwendet. Zur Überprüfung evtl.

vorhandener latenter Infektionen bzw. bakterieller oder pilzlicher Kontaminationen wurden in allen Befallstests zusätzliche Blattscheiben, die keine Symptome zeigten, als Kontrollen ausgelegt.

Für alle Befallsuntersuchungen wurden keine vollständigen Blätter, sondern Blattscheiben verwendet. Zur Herstellung von Blattscheiben mit wahlweise 20 oder 25 mm Durchmesser diente eine spezialangefertigte **Blattstanze**. Diese ermöglichte durch ein besonderes Schneidwerkzeug mit Wellenschliff sauberes und quetschungsfreies Ausschneiden der Scheiben. Glatte Schnittkanten sind für die Verminderung von bakteriellen und pilzlichen Sekundärinfektionen besonders wichtig.

Durch die einfache Funktionsweise und die gute Handhabung des Gerätes können große Blattmengen in kurzer Zeit zu Blattscheiben verarbeitet werden. Ferner ermöglichen die gleichgroßen Blattscheiben eine optimale Platzausnutzung in den Bewässerungsboxen und vereinfachen und präzisieren zudem die Befallsbonitur. In den 20 x 20 cm großen Schalen finden 64 kleine (20 mm) bzw. 49 große (25 mm) Blattscheiben Platz.

Die Inkubation der Befallstests in Bewässerungsboxen erfolgte in **Inkubationsschränken** mit seitlich angeordneten Leuchtstoffröhren. Die durchschnittliche Lichtleistung, die in der Mitte der Schränke etwa 15 bis 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  betrug, war ausreichend, um das Blattmaterial in gestapelten Bewässerungsboxen photosynthetisch aktiv zu halten.

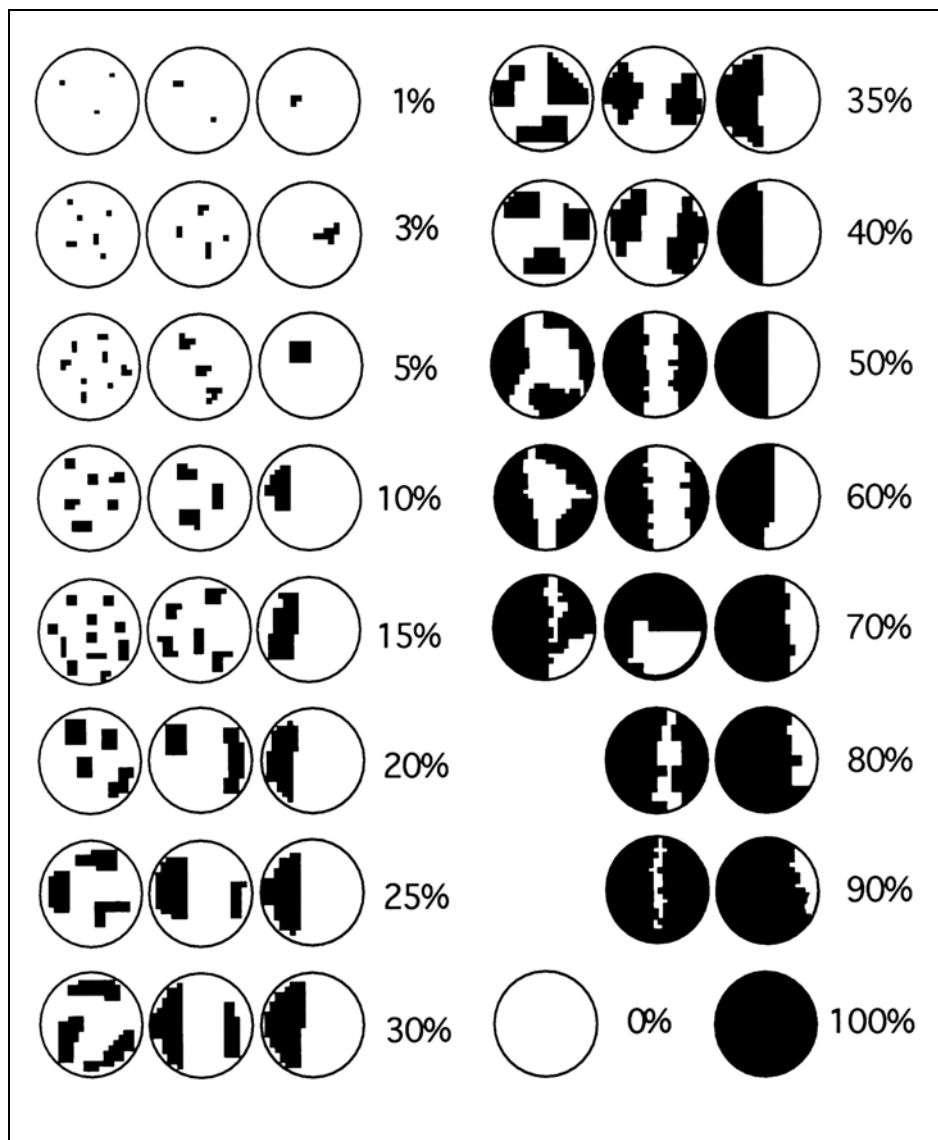
Für alle Tests wurde eine Tag/Nachtperiode von 16/8 Stunden eingehalten. Die Inkubationstemperaturen und die Licht/Dunkelheit-Perioden wurden dem Versuchsaufbau entsprechend unter Berücksichtigung der optimalen Wachstumsansprüche des jeweiligen Pathogens gewählt (siehe Kapitel 3.7.1 bis 3.7.4).

### 3.9.2 Bonitur der Blattscheibentests

Zur quantitativen Befallsbestimmung nach Inokulation mit verschiedenen Erregern, diente ein speziell für Blattscheiben entwickeltes iteratives Boniturverfahren (GIEFFERS & FLADUNG, 1999). Hierbei wird für jede einzelne Blattscheibe visuell der prozentuale Anteil der Befallsfläche an der Gesamtfläche ermittelt. Dabei wird zunächst geschätzt, ob mehr oder weniger als 50 % der Blattscheibe durch Pathogenbefall nekrotisiert ist. Im nächsten Schritt wird der Befall auf größer oder kleiner 25 bzw. 75 % geschätzt. So kann schrittweise die exakte Befallsfläche bestimmt werden. Erfahrungsgemäß ist der Boniturfehler dieses Verfahrens bei Werten unter 50 % kleiner als 5 % und bei Werten über 50 % kleiner als 10 %.

Zur Unterstützung der Befallseinschätzung kann die Boniturtafel (Abb. 9) mit insgesamt 45 Schaubilder, die in 5%-Schritten unterschiedliche Befallsstärken mit verschiedenen Befallsverteilungen auf einer kreisrunden Fläche darstellen, zur Hilfe genommen werden. Jede Blattscheibe kann somit einem der maßstabsgenauen Schaubilder zugeordnet und ihr prozentualer Befallswert eingeschätzt werden.

Da insbesondere bei Freilandmaterial latenter Befall nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden für jeden Versuch einige Blattscheiben als nicht inokulierte Kontrollen verwendet. Hierdurch ließen sich auch eventuell auftretende natürliche Vergilbungen, Nekrosen oder Welken sicher erkennen und gegebenenfalls bei der Bonitur der inokulierten Blattscheiben berücksichtigen.



**Abb. 9:** Boniturschema zur Veranschaulichung der iterativen Bonitur an Blattscheiben (nach Gieffers, unveröffentlicht); für jede Boniturstufe sind drei mögliche Verteilungsmuster des Befalls dargestellt.

### **3.10 Statistik**

Die Verrechnung der Daten erfolgte mit den Statistikprogrammen SPSS und Statistica. Wegen Varianzinhomogenitäten bei einigen Versuchsreihen wurden parameterfreie Tests verwendet. Die Ergebnisse der Blattscheibentests wurden daher mit dem Wilcoxon-Test für paarweise Mittelwertvergleiche verrechnet. In allen Verrechnungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit auf  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Mit Hilfe der Korrelationsanalyse (Produkt-Moment-Korrelation) erfolgte die Bestimmung der Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Testreihen.

## 4 Ergebnisse

Wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit waren phytopathologische Untersuchungen mit verschiedenen pilzlichen Erregern an Kartoffel- und Tabakpflanzen. Grundlage für diese Untersuchungen bildete ein *in vitro*-Test, bei dem Blattscheiben in Bewässerungsboxen inkubiert wurden. Da unterschiedliche Wirt-Pathogen-Kombinationen getestet wurden, mußten anhand zahlreicher Vorversuche die Inokulationsmethoden und die Inkubationsbedingungen den entsprechenden Systemen angepaßt werden.

*Botrytis cinerea* und *Phytophthora nicotianae* als wirtschaftlich wichtige Tabakpathogene wurden zur Überprüfung der Resistenzniveaus transgener Tabakpflanzen verwendet. Resistenzuntersuchungen an transgenen Kartoffelpflanzen wurden mit den Pathogenen *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* durchgeführt.

Neben den Befallsuntersuchungen an transgenen Pflanzen wurden auch Untersuchungsmethoden zur *in vitro*-Wirkung verschiedener Abwehrproteine auf pilzliche Erreger erarbeitet. Dabei lieferten Keimschlauchlängentests und ein Sporangienfärbetest Ergebnisse zur Aktivität und Wirkungsweise dieser Substanzen auf Sporenkeimung und Myzelwachstum phytopathogener Pilze.

### 4.1 Transgene Pflanzen mit den Abwehrproteinen Glukanase, Chitinase und RIP

#### 4.1.1 Resistenzuntersuchungen an transgenem Tabak

Ausgangsmaterial für die Transformation von PR-Proteinen in Tabak waren Pflanzen der Wildtyplinie SR1. Für alle Befallstests dienten Pflanzen dieser Linie als nicht-transgene Kontrollen.

Untersucht wurden zwei von Dr. G. Jach (MPI für Züchtungsforschung, Köln) bereitgestellte transgene Tabaklinien, die eine Exochitinase (CHI-A) des Bodenbakteriums *Serratia marcescens* bzw. das Ribosomen-inaktivierende Protein (RIP) aus Gerste exprimierten. Zur Überprüfung möglicher synergistischer Effekte dieser beiden Proteine sollte eine dritte Linie, die diese Proteine koexprimierte, verwendet werden. Aus den zur Verfügung stehenden Transformanten der F1-Generation wurden die Linien SR1 x 28-6.11 (RIP), SR1 x 34-3.1 (CHI-A) und 34-3.1 x 28-6.9 (CHI-A x RIP), aufgrund der hohen Fremdproteingehalte ausgewählt.

Die Pflanzen dieser Linien zeigten sowohl in der Anzuchtphase auf kanamycinhaltigem Nährmedium als auch bei der weiteren Kultivierung im Gewächshaus keine Unterschiede in ihrer Entwicklung und keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu SR1.

Für die Blattscheibentests wurden zwischen dem 5-Blatt-Stadium und dem Beginn der Blüte jeweils aus der mittleren Blattetage Blätter entnommen. Die erste Bonitur des Befalls erfolgte in der Regel drei Tage nach der Inokulation. Die Abweichungen der Befallshöhen zwischen den Versuchen sind auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen und geringfügige Abweichungen in den Zeitpunkten der Bonitur zurückzuführen.

Es wurden insgesamt 14 unabhängige Befallsversuche mit *B. cinerea* zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Untersuchungen. Die zusammengefaßten Ergebnisse der Versuche sind in der letzten Zeile der Tabelle als relative Befallswerte im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle SR1 dargestellt.

**Tab. 2: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Botrytis cinerea* an transgenen Tabaklinien. Angegeben sind die Boniturwerte 14 unabhängiger Versuche als durchschnittlich befallene Blattscheibenfläche in Prozent. (RIP=Ribosomen-inaktivierendes Protein, CHI-A=Chitinase-A, Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu SR1).**

| Versuch-Nr. | SR1   | SR1 x 28-6.11<br>(RIP) | SR1 x 34-3.1<br>(CHI-A) | 34-3.1 x 28-6.9<br>(CHI-A x RIP) |
|-------------|-------|------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1           | 70,4  | 49,3                   | 68,2                    | 45,4                             |
| 2           | 65,6  | 48,8                   | 43,8                    | 44,0                             |
| 3           | 39,7  | 56,9                   | 12,9                    | 7,1                              |
| 4           | 50,8  | 44,9                   | 26,3                    | 36,4                             |
| 5           | 80,5  | 75,7                   | 62,7                    | 59,8                             |
| 6           | 16,2  | 6,5                    | 7,8                     | 25,4                             |
| 7           | 19,0  | 15,9                   | 11,6                    | 12,2                             |
| 8           | 67,9  | 39,2                   | 56,1                    | 46,5                             |
| 9           | 38,8  | 14,5                   | 23,9                    | 13,7                             |
| 10          | 46,7  | 23,1                   | 36,9                    | 18,3                             |
| 11          | 44,8  | 25,8                   | 45,7                    | 29,5                             |
| 12          | 37,1  | 21,8                   | 17,3                    | 31,5                             |
| 13          | 58,2  | 77,1                   | 34,7                    | 33,8                             |
| 14          | 39,3  | 20,7                   | 13,4                    | 18,9                             |
| Mw.         | 48,2  | 37,2                   | 33,0                    | 30,2                             |
| relativ     | 100,0 | 77,1                   | 68,4                    | 62,6                             |

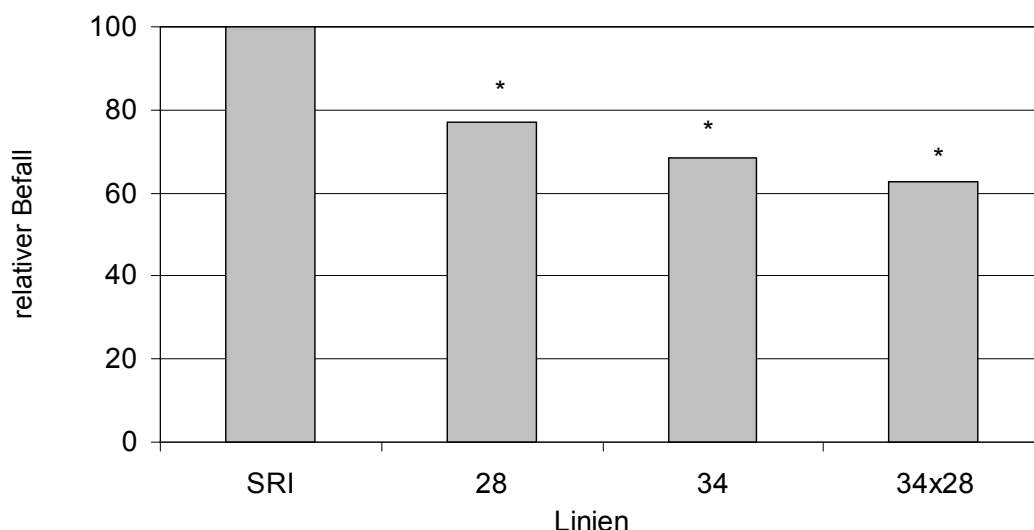
**Tab. 3: Vergleich der aus den Mittelwerten der Kreuzungspartner berechneten Erwartungswerte mit den tatsächlichen Befallsmittelwerten der Kreuzungslinie 34-3.1x28-6.9 nach Inokulation mit *Botrytis cinerea* (Mw.=Mittelwert).**

| Vers.-Nr.     | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | Mw.  |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Erw. Wert     | 58,8 | 46,3 | 34,9 | 35,6 | 69,2 | 7,5  | 13,8 | 47,7 | 19,2 | 30   | 35,8 | 19,6 | 55,9 | 17,1 | 35,1 |
| 34-3.1x28-6.9 | 45,4 | 44   | 7,1  | 36,4 | 59,8 | 25,4 | 12,2 | 46,5 | 13,7 | 18,3 | 29,5 | 31,5 | 33,8 | 18,9 | 30,2 |

RIP exprimierende Tabakpflanzen der Linie 28-6.11 zeigten im Mittel der Versuche mit ca. 37 % durchschnittlicher Befallsfläche eine Befallsreduktion von ca. 22 % im Vergleich zu SR1. Transgene Pflanzen mit dem CHI-A-Protein waren nach Auswertung aller Tests um ca. 31 % weniger stark mit *B. cinerea* befallen als SR1. Beide Proteine vermitteln somit deutlich verstärkte quantitative Resistenz gegen diesen Erreger.

Die Kreuzungslinie 34-3.1x28-6.9, die beide Abwehrproteine exprimierte, war mit durchschnittlich 30,2 % befallener Blattscheibenfläche und einer Befallsreduktion von etwa 37 % gegenüber SR1 die Linie mit dem höchsten Resistenzniveau. In Tabelle 3 wurden die Erwartungswerte für das Resistenzniveau dieser Linie aus den Mittelwerten der Kreuzungspartner berechnet. Ein Vergleich der Werte zeigt, daß elf der ermittelten 14 Befallswerte die Erwartungswerte übertreffen. Die erfolgreiche Expression beider Proteine führte somit zu einer quantitativen Resistenz der Linie 34-3.1x28-6.9, die aufgrund des Zusammenwirkens der Resistenzfaktoren über dem erwarteten Maß lag.

Die Mittelwerte der Versuche wurden mit dem Friedmann-Test für verbundene Stichproben statistisch untersucht. Daraus ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Grundgesamtheiten. Die Überprüfung der Befallsmittelwerte im Wilcoxon-Test zeigte, daß jede der drei transgenen Linien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant von SR1 verschieden war. Zwischen den drei transgenen Linien gab es keine statistisch absicherbaren Unterschiede.



**Abb. 10:** Relativer Befall der transgenen Tabaklinien 28-6.11 (RIP), 34-3.1 (CHI-A) und 34-3.1 x 28-6.9 (RIP/CHI-A) mit *Botrytis cinerea* im Verhältnis zu SR1; Mittelwerte aus 14 Resistenztests. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

In gleicher Weise wie mit *B. cinerea* sind auch Blattscheibentests mit *P. nicotianae* durchgeführt worden. Die Inokulation erfolgte dabei ebenfalls durch Aufsetzen myzelbewachsener Agarstücke auf die Unterseiten von Blattscheiben. Die Inkubation der Befallstests erfolgte bei 20 bis 22 °C. Insgesamt wurden 12 unabhängige Versuche mit Pflanzen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen der Befallsstärke der einzelnen Linien und dem Pflanzenalter festgestellt werden. Die Mittelwerte der Versuche sind in Tabelle 4 dargestellt. Abbildung 11 zeigt die relativen Befallsmittelwerte der transgenen Tabaklinien im Verhältnis zur nicht-transgenen Kontrolle SR1.

**Tab. 4: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Phytophthora nicotianae* an transgenen Tabaklinien. Angegeben sind die Boniturwerte 12 unabhängiger Versuche als durchschnittlich befallene Blattscheibenfläche in Prozent (RIP=Ribosomen-inaktivierendes Protein, CHI-A=Chitinase-A, Mw.= Mittelwert, relativ=Befall relativ zu SR1).**

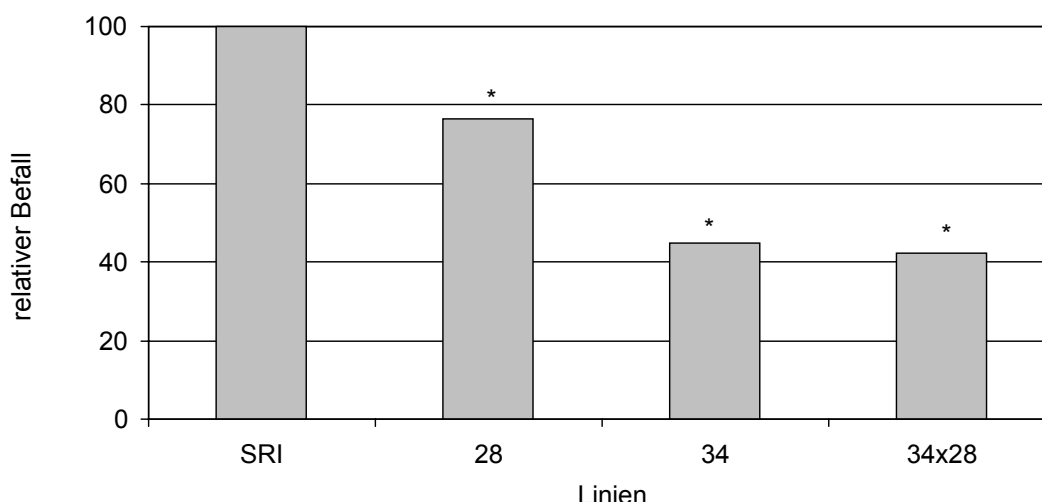
| Versuch-Nr. | SR1   | SR1 x 28-6.11<br>(RIP) | SR1 x 34-3.1<br>(CHI-A) | 34-3.1 x 28-6.9<br>(CHI-A x RIP) |
|-------------|-------|------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1           | 25,2  | 0,9                    | 2,4                     | 8,3                              |
| 2           | 60,7  | 69,8                   | 25,6                    | 20,0                             |
| 3           | 51,9  | 65,4                   | 8,5                     | 4,0                              |
| 4           | 27,6  | 17,5                   | 20,6                    | 15,0                             |
| 5           | 58,6  | 32,4                   | 15,7                    | 40,0                             |
| 6           | 51,8  | 48,7                   | 50,2                    | 31,2                             |
| 7           | 35,4  | 21,3                   | 7,8                     | 10,5                             |
| 8           | 15,6  | 0,5                    | 0,0                     | 0,0                              |
| 9           | 35,4  | 21,3                   | 7,8                     | 10,5                             |
| 10          | 11,9  | 9,7                    | 5,4                     | 3,2                              |
| 11          | 43,6  | 26,2                   | 28,8                    | 31,4                             |
| 12          | 55,9  | 48,4                   | 40,3                    | 26,7                             |
| Mw.         | 39,5  | 30,2                   | 17,8                    | 16,7                             |
| relativ     | 100,0 | 76,5                   | 45,0                    | 42,4                             |

Die transgene RIP-exprimierende Linie 28-6.11 zeigte im Vergleich zu SR1 mit durchschnittlich 30,2 % befallener Blattscheibenfläche eine relative Befallsverringerung um 23,5 %. Anhand der in Tabelle 4 gezeigten Einzelergebnisse ist zu erkennen, daß die Befallswerte zwischen den Versuchen schwanken. In zwei der 12 Tests (Versuch-Nr. 2 und 3) lag der Befallsmittelwert höher als bei SR1. Die Verrechnung der Daten im Wilcoxon-Test ergab aber dennoch eine deutliche Signifikanz zwischen der transgenen Linie 28-6.11 und der nicht-transgenen Kontrolle (Abb. 11). Die Ergebnisse zeigen, daß das in Tabak transformierte Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerstenkörnern Resistenz gegen den Pilz *P. nicotianae* vermittelt.



Sehr gute Wirkung *in planta* gegen diesen Erreger zeigte auch die in Tabak transformierte Chitinase aus *S. marcescens*. Blattscheiben der Linie 34-3.1 waren im Mittel 55 % weniger stark mit *P. nicotianae* befallen als Blattscheiben von SR1-Pflanzen (Abb. 11). Die statistische Verrechnung der Daten ergab eine deutliche Signifikanz zwischen der Linie 34-3.1 und SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Mit ca. 57 % Befallsverringering war die Doppelkonstrukt-Linie 34-3.1x28-6.9 die transgene Linie mit der stärksten Resistenz gegen *P. nicotianae*. Wie bereits bei den Befallstests mit *B. cinerea* gezeigt werden konnte, wiesen Tabakpflanzen, die beide Proteine exprimierten, auch nach Inokulation mit *P. nicotianae* geringfügig bessere Resistenz auf als der beste Kreuzungspartner. Tabelle 5 zeigt, daß die Boniturwerte in neun von 12 Versuchen niedriger lagen als die aus den Mittelwerten der Kreuzungspartner berechneten Erwartungswerte.



**Abb. 11:** Relativer Befall der transgenen Tabaklinien SR1 x 28-6.11 (RIP), SR1 x 34-3.1 (CHI-A) und 34-3.1 x 28-6.9 (RIP/CHI-A) mit *Phytophthora nicotianae* im Verhältnis zu SR1; Mittelwerte aus 12 Resistenztests. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

**Tab. 5:** Vergleich der aus den Mittelwerten der Kreuzungspartner berechneten Erwartungswerte mit den tatsächlichen Befallsmittelwerten der Kreuzungslinie 34-3.1x28-6.9 nach Inokulation mit *Phytophthora nicotianae* (Mw.=Mittelwert).

| Vers.-Nr.     | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10  | 11   | 12   | Mw.  |
|---------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|
| Erw. Wert     | 1,7 | 47,7 | 37,0 | 19,1 | 24,1 | 49,5 | 14,6 | 0,25 | 14,6 | 7,6 | 27,5 | 44,4 | 24,0 |
| 34-3.1x28-6.9 | 8,3 | 20,0 | 4,0  | 15,0 | 40,0 | 31,2 | 10,5 | 0,0  | 10,5 | 3,2 | 31,4 | 26,7 | 16,7 |

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sowohl das Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerstenkörnern als auch die Chitinase aus *S. marcescens* in Tabak Resistenz gegen die phytopathogenen Pilze *B. cinerea* und *P. nicotianae* vermitteln.

Die *in planta*-Wirkung der Chitinase gegen die Erreger *B. cinerea* und *P. nicotianae* lag insgesamt etwas höher als die Wirkung des RIP. In beiden Versuchsreihen zeigten Doppelkonstrukt-Pflanzen Resistenzniveaus, die die berechneten Erwartungswerte übertrafen und leicht über dem Ergebnis des besten Kreuzungspartners lagen (Tabellen 3 und 5).

Wie bereits gezeigt wurde, konnte das Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerste erfolgreich in Tabak exprimiert werden. Durch die Fusion des RIP-Proteins mit einem Signalpeptid wurde dabei die Sekretion des Proteins in den Zellwandbereich erzielt. In den Befallstests zeigte sich eine deutlich verringerte Anfälligkeit dieser Pflanzen nach Inokulation mit zwei Erregern.

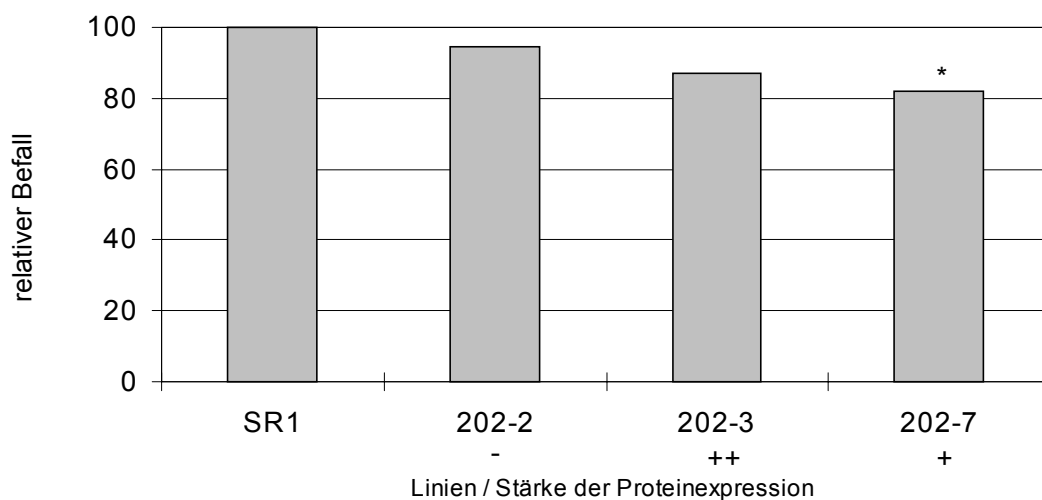
Damit das RIP inhibierend auf die Proteinsynthese wirken kann, muß es zunächst von der Pilzzelle aufgenommen werden. Der eigenständige Eintritt in Pathogenzellen ist dem Protein nicht möglich. Wahrscheinlich erfolgt die Aufnahme des RIP in die Pilzzelle unspezifisch durch Endozytose. Da vermutlich dieser Aufnahmemechanismus die Wirkung des Proteins limitiert, könnte die Erhöhung der Konzentration des RIP im Bereich der Pilzhypen möglicherweise zu einer verstärkten Aufnahme führen.

Die Ausstattung des RIP mit einer Domäne, die die Bindung des Proteins an eine pilzliche Zellwandkomponente, wie z.B. Chitin, ermöglicht, könnte zur Erhöhung der Konzentration des RIP in der Hyphenregion führen. Daraus resultierte dann eine verstärkte Aufnahmerate in die Pilzzelle und damit eine Erhöhung des Wirkungsgrades des Proteins. Für diesen Ansatz wurde daher ein Lectin aus der Brennessel (*Urtica dioica*) verwendet, das als Chitinbindungsdomäne dient. Verbunden mit diesem Lectin ist eine Spacerregion, deren Wirkung nicht näher bekannt ist.

Nach den Klonierungsarbeiten und der Transformation des Lectin-RIPs in Tabak wurden anhand von Westernblots aus den vorhandenen Linien drei Linien ausgewählt, die das Protein nicht nachweisbar (Linie 202-2), stark (Linie 202-3) bzw. nur schwach (Linie 202-7) exprimierten. Die Pflanzen wurden auf kanamycinhaltigem Agar angezogen und anschließend im Gewächshaus kultiviert. Zur Überprüfung der Resistenzniveaus der transgenen Pflanzen wurden Befallstests mit *B. cinerea* und *P. nicotianae* in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse der Befallstests mit *B. cinerea* sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tab. 6:** Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Botrytis cinerea* an transgenen, Lectin-RIP exprimierenden Tabaklinien; Befallsmittelwerte sieben unabhängig durchgeführter Blattscheibentests. Die Zeichen -, + und ++ geben die Stärke der Proteinexpression an (Mw.= Mittelwert, relativ=Befall relativ zu SR1).

| Versuch-Nr. | SR1   | 202-2<br>- | 202-3<br>++ | 202-7<br>+ |
|-------------|-------|------------|-------------|------------|
| 1           | 26,9  | 24,8       | 18,8        | 19,1       |
| 2           | 30,0  | 17,9       | 30,8        | 19,2       |
| 3           | 41,4  | 39,9       | 45,7        | 37,4       |
| 4           | 30,2  | 17,8       | 17,8        | 11,9       |
| 5           | 12,8  | 17,9       | 11,7        | 11,7       |
| 6           | 34,6  | 35,6       | 34,2        | 30,8       |
| 7           | 88,9  | 96,1       | 71,4        | 87,4       |
| Mw.         | 37,8  | 35,7       | 32,9        | 31,1       |
| relativ     | 100,0 | 94,4       | 87,0        | 82,1       |



**Abb. 12:** Relativer Befall der transgenen, Lectin-RIP exprimierenden Tabaklinien mit *Botrytis cinerea* im Verhältnis zu SR1; Mittelwerte aus acht Resistenztests. Die Zeichen -, + und ++ geben die Stärke der Proteinexpression an. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Befallsmittelwerte sieben unabhängiger Versuche zeigten, daß zwischen der nicht-transgenen Kontrolle SR1 und der transgenen Linie 202-2, für die im Westernblot kein Lectin-RIP nachgewiesen worden war, keine hohen Unterschiede bestanden (Abb. 12). Mit nur 5,6 % durchschnittlicher Befallsdifferenz sind die beiden Variablen erwartungsgemäß nicht signifikant verschieden (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Pflanzen der schwach exprimierenden Linie 202-7 und der stark exprimierenden Linie 202-3 wiesen vergleichbare Resistenzniveaus auf. Mit 82 bzw. 87 % relativem Befall im Vergleich

zu SR1 war die resistenzvermittelnde Wirkung des Lectin-RIP sogar geringfügig schwächer als die Wirkung des RIP ohne die Chitinbindungsdomäne (siehe oben).

Durch die Fusion des Ribosomen-inaktivierenden Proteins mit dem Lectin aus Brennessel konnte somit das angestrebte Ziel einer verbesserten quantitativen Resistenz gegen *B. cinerea* durch verstärkte Akkumulation des Proteins im Zellwandbereich des Pilzes nicht erreicht werden. Das Resistenzniveau dieser Pflanzen nach Inokulation mit *B. cinerea* war vergleichbar mit dem Resistenzniveau von RIP-Pflanzen ohne Lectin (Linie 28-6.11).

Der Befallsmittelwert der schwach-exprimierenden Linie 202-7 lag geringfügig niedriger als der Befallsmittelwert der stark-exprimierenden Linie 202-3. Eine Abhängigkeit zwischen Stärke der Proteinexpression und dem Resistenzgrad transgener Pflanzen konnte in diesem Fall nicht festgestellt werden. Nur die Linie 202-7 erwies sich als signifikant verschieden zu SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Lectin-RIP-Linien wurden auch auf ihr Resistenzverhalten nach Inokulation mit *P. nicotianae* getestet, obwohl dieser Erreger kein Chitin als Bestandteil der Zellwände enthält. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse acht unabhängig voneinander durchgeführter Versuche.

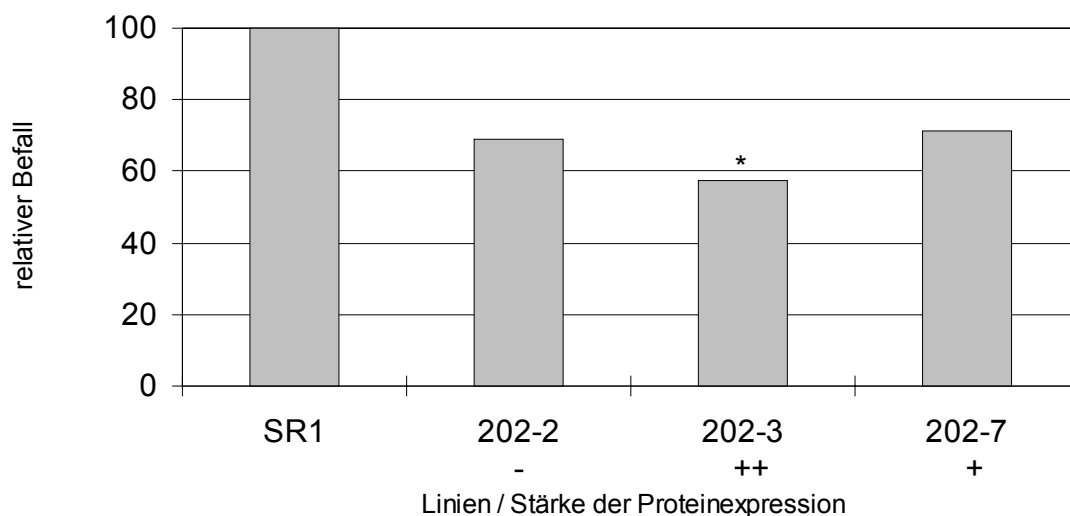
**Tab. 7: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Phytophthora nicotianae* an transgenen, Lectin-RIP exprimierenden Tabaklinien; Befallsmittelwerte acht unabhängig durchgeführter Blattscheibentests. Die Zeichen -, + und ++ geben die Stärke der Proteinexpression an (Mw.= Mittelwert, relativ=Befall relativ zu SR1, n.u.=nicht untersucht).**

| Versuch-Nr.    | SR1          | 202-2<br>-   | 202-3<br>++  | 202-7<br>+   |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1              | 35,48        | 33,81        | 26,67        | 21,67        |
| 2              | 12,26        | 5,24         | 16,67        | 21,79        |
| 3              | 34,60        | 26,50        | 5,90         | 8,45         |
| 4              | 24,83        | 3,45         | 15,83        | 19,17        |
| 5              | 26,31        | 23,50        | 18,86        | 15,83        |
| 6              | 21,43        | 3,36         | 1,64         | 7,17         |
| 7              | 36,33        | 46,14        | 21,74        | 31,40        |
| 8              | 43,57        | n.u.         | 27,98        | 42,29        |
| <b>Mw.</b>     | <b>29,35</b> | <b>20,29</b> | <b>16,91</b> | <b>20,97</b> |
| <b>relativ</b> | <b>100</b>   | <b>69,1</b>  | <b>57,6</b>  | <b>71,4</b>  |

Bei genauerer Betrachtung der Versuchsmittelwerte sind starke Schwankungen zwischen den einzelnen Testergebnissen zu erkennen. Insbesondere die Linie 202-2 zeigte sehr unterschiedliche Befallswerte nach Inokulation mit *P. nicotianae*. Verhältnismäßig geringe Schwankungen wies die stark-exprimierende Linie 202-3 auf. In der statistischen Verrechnung ergaben sich daher nur für die Linie 202-3 signifikante Befallsunterschiede zu

SR1. Die beiden anderen Linien zeigten keine Signifikanzen bei der Analyse mit dem Wilcoxon-Test.

Mit einer Befallsreduzierung von ca. 42 % im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle zeigte die Linie 202-3 das höchste Resistenzniveau gegenüber *P. nicotianae* (Abb. 13). Die schwach-exprimierende Linie 202-7 wies im Mittel um ca. 29 % verringerte Befallswerte auf. Wodurch die verringerten Befallswerte der schwach-exprimierenden Linie 202-2 in einigen der Versuche begründet sind, muß in weiterführenden Tests untersucht werden.



**Abb. 13:** Relativer Befall der transgenen Lectin-RIP exprimierenden Tabaklinien mit *Phytophthora nicotianae* im Verhältnis zu SR1; Mittelwerte aus acht Resistenztests. Die Zeichen -, + und ++ geben die Stärke der Proteinexpression an. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu SR1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Im Vergleich zu den Untersuchungen mit Pflanzen, die das RIP ohne Lectin exprimierten (Linie 28-6.11), zeigt sich bei Lectin-RIP-Pflanzen eine verbesserte Resistenzwirkung. Diese läßt sich allerdings nicht unbedingt mit der Funktion der Chitinbindungsdomäne erklären, da *P. nicotianae* kein Chitin als Bestandteil der Zellwände enthält. Möglicherweise ist eine stärkere Expression des Ribosomen-inaktivierenden Proteins in der Linie 202-3 für das höhere Resistenzniveau verantwortlich.

#### 4.1.2 Resistenzuntersuchungen an transgenen Kartoffeln

Neben transgenen Tabakpflanzen, die die Abwehrproteine Glukanase, Chitinase und RIP exprimierten, wurden von der Arbeitsgruppe Dr. G. Jach auch Kartoffelpflanzen mit diesen Proteinen hergestellt. Phytopathologisch untersucht wurden in dieser Arbeit insgesamt 22 Linien, die entweder das Ribosomen-inaktivierende Protein oder die Kombinationen Glukanase/Chitinase, RIP/Chitinase bzw. Glukanase/RIP exprimierten.

Die vorhandenen Pflanzen wurden aus Knollen herangezogen und in dreimaliger Folge im Gewächshaus angebaut. In dieser Zeit erfolgten sechs unabhängige Befallstests mit *P. infestans*.

Für transgene Kartoffelpflanzen, die die Abwehrproteine GLU, CHI-A und RIP produzierten, standen leider keine transgenen Kontrollen, die nur das nptII-Gen exprimierten, zur Verfügung. Ein direkter Vergleich einer eventuellen Wirkung dieses Gens und der Wirkung der Abwehrproteine ist somit nicht möglich.

In Tabelle 8 sind die Befallsmittelwerte der nicht-transgenen Kontrolle Désirée und neun ausgewählter transgener Linien dargestellt. Anhand der Einzelwerte ist zu erkennen, daß die Befallsmittelwerte der einzelnen Linien zwischen den Versuchen einige Schwankungen aufweisen. Trotzdem waren acht der neun ausgewählten transgenen Linien in der statistischen Verrechnung mit dem Wilcoxon-Test ( $p \leq 0,05$ ) signifikant verschieden von Désirée. Mit Ausnahme der Linien 5102/3 zeigen alle Linien relative Befallsreduzierungen zwischen ca. 40 und 50 % (Abb. 14).

Die hier dargestellten neun Kartoffellinien waren in den Befallstests mit *P. infestans* die Linien mit der stärksten mittleren Befallsreduktion. Die übrigen 13 untersuchten, hier jedoch nicht gezeigten Linien wiesen vergleichsweise geringe Befallsreduktionen oder sehr starke Schwankungen zwischen den einzelnen Testergebnissen auf. Insgesamt vermittelten die Abwehrproteine deutlich verstärkte Resistenz gegen den Pathogen *P. infestans*. Dabei zeigten sowohl das RIP als auch die hier verwendeten Kombinationen zweier Proteine sehr gute Wirkung gegen den Erreger. Die Linie 2104/1, die lediglich RIP exprimierte, wiesen einen im Mittel um ca. 47 % verringerten Befall mit *P. infestans* auf. Die Resistenzniveaus der Linien 4301/2, 4301/4, 5102/3 und 5114/1, die das RIP in Kombination mit Chitinase bzw. Glukanase bildeten, lagen zwischen 31 bis 47 % niedriger als bei der Kontrolle. Die Kombination des RIP mit einem hydrolytischen Enzym führte im Vergleich zu Einzelkonstruktpflanzen zu keiner weiteren Erhöhung der Resistenz von Kartoffeln. Für Kartoffelpflanzen mit dem Doppelkonstrukt GLU/CHI-A (3102/4, 3402/2, 3402/3, 3602/3) wurden Befalls-reduktionen zwischen 42 und 52 % ermittelt.

Tab. 8: Übersichtstabelle zu den Blattscheibentests mit *Phytophthora infestans* an neun transgenen Kartoffellinien der Sorte Désirée mit unterschiedlichen Kombinationen von Abwehrproteinen; Befallsmittelwerte sechs unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (RIP=Ribosomen-inaktivierendes Protein, GLU=Glukanase, CHI=Chitinase, Mw.= Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Désirée).

| Versuch Nr. | Désirée | 2104/1<br>RIP | 3102/4<br>GLU/CHI | 3402/2<br>GLU/CHI | 3402/3<br>GLU/CHI | 3602/3<br>GLU/CHI | 4301/2<br>RIP/CHI | 4301/4<br>RIP/CHI | 5102/3<br>GLU/RIP | 5114/1<br>GLU/RIP |
|-------------|---------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1           | 59,6    | 17,6          | 0,2               | 28,9              | 6,9               | 36,7              | 11,8              | 4,8               | 17,0              | 18,4              |
| 2           | 19,4    | 15,2          | 16,3              | 17,8              | 18,6              | 13,2              | 18,4              | 22,5              | 14,9              | 13,5              |
| 3           | 51,6    | 30,6          | 19,6              | 3,6               | 28,2              | 18,9              | 38,6              | 41,3              | 67,3              | 30,3              |
| 4           | 23,1    | 12,6          | 19,2              | 8,8               | 8,9               | 5,8               | 4,7               | 9,5               | 12,2              | 12,9              |
| 5           | 58,6    | 45,4          | 33,6              | 24,1              | 54,6              | 47,7              | 40,7              | 38,2              | 38,7              | 35,4              |
| 6           | 52,0    | 19,6          | 50,0              | 42,3              | 36,7              | 30,0              | 28,9              | 31,5              | 32,2              | 27,8              |
| Mw.         | 44,0    | 23,5          | 23,1              | 20,9              | 25,7              | 25,4              | 23,9              | 24,6              | 30,4              | 23,0              |
| relativ     | 100,0   | 53,4          | 52,6              | 47,5              | 58,3              | 57,7              | 54,2              | 56,0              | 69,0              | 52,3              |

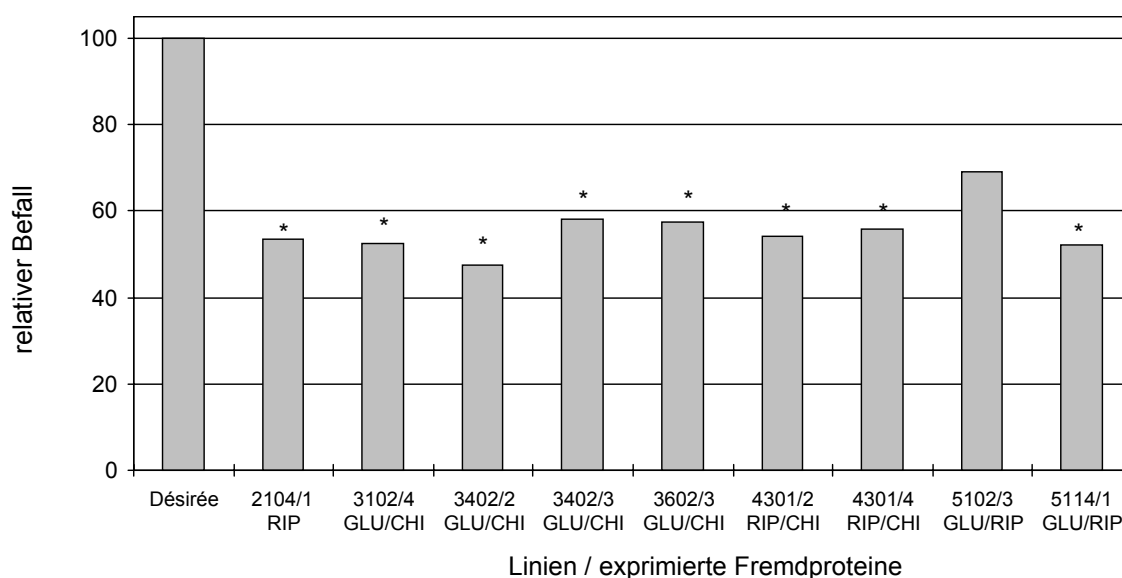


Abb. 14: Relativer Befall mit *Phytophthora infestans* an neun transgenen Kartoffellinien im Verhältnis zu Désirée; Mittelwerte aus sechs Resistenztests (RIP=Ribosomen-inaktivierendes Protein, GLU=Glukanase, CHI=Chitinase). Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu Désirée (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).

## 4.2 Antimikrobielle Wirkung des Lysozyms *in vitro*

### 4.2.1 Keimschlauchlängentests

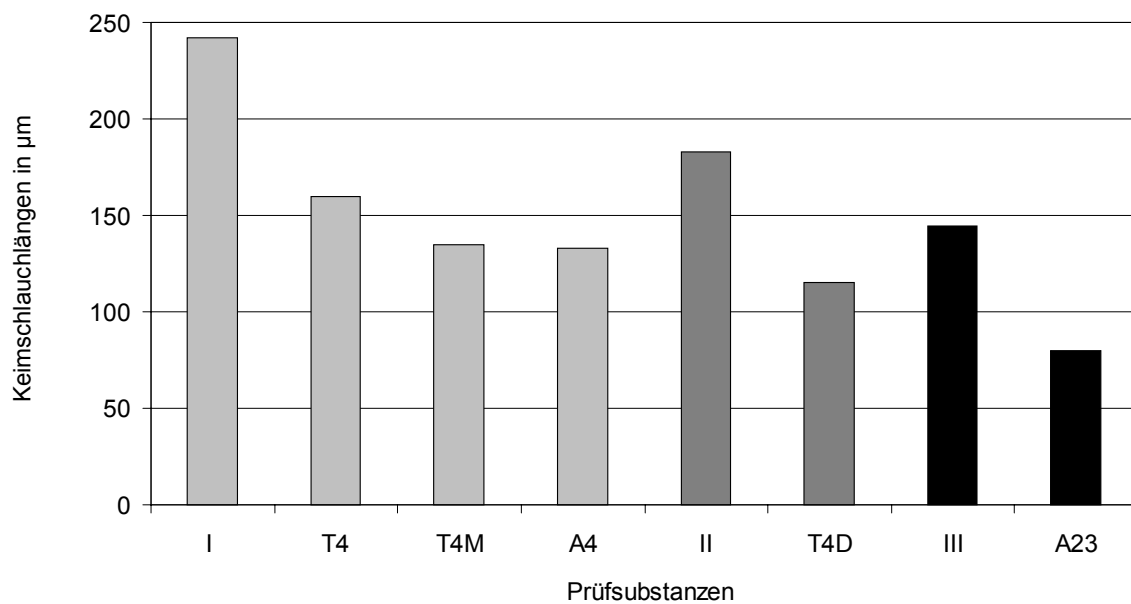
Neben transgenen Pflanzen mit den Resistenzproteinen Chitinase, Glukanase und RIP sollten in dieser Arbeit auch transgene Kartoffelpflanzen, die T4-Lysozym exprimierten, auf Resistenz gegen phytopathogene Pilze getestet werden. Dazu wurden zunächst *in vitro*-Versuche durchgeführt, um Erkenntnisse zur Wirkung des Proteins gegen einige wichtige pilzliche Erreger zu erhalten.

Zur Überprüfung möglicher wachstumshemmender Effekte verschiedener Proteine *in vitro* auf phytopathogene Pilze eignen sich insbesondere Tests mit keimenden Sporen. In dem hier ausgewählten Verfahren werden Konidien in Pufferlösungen mit den zu untersuchenden Stoffen auf Agar getropft, inkubiert und entsprechend den Anforderungen der einzelnen Erreger für 7 bis 72 Stunden inkubiert. Durch Längenmessung der von den Sporen gebildeten Keimschläuche und Bestimmen der Keimraten können Aussagen über die Wirksamkeit der Proteine gemacht werden. Da Zoosporen von *P. infestans* nicht in den üblichen Pufferlösungen keimten, wurde zunächst *P. nicotianae* als Testorganismus verwendet.

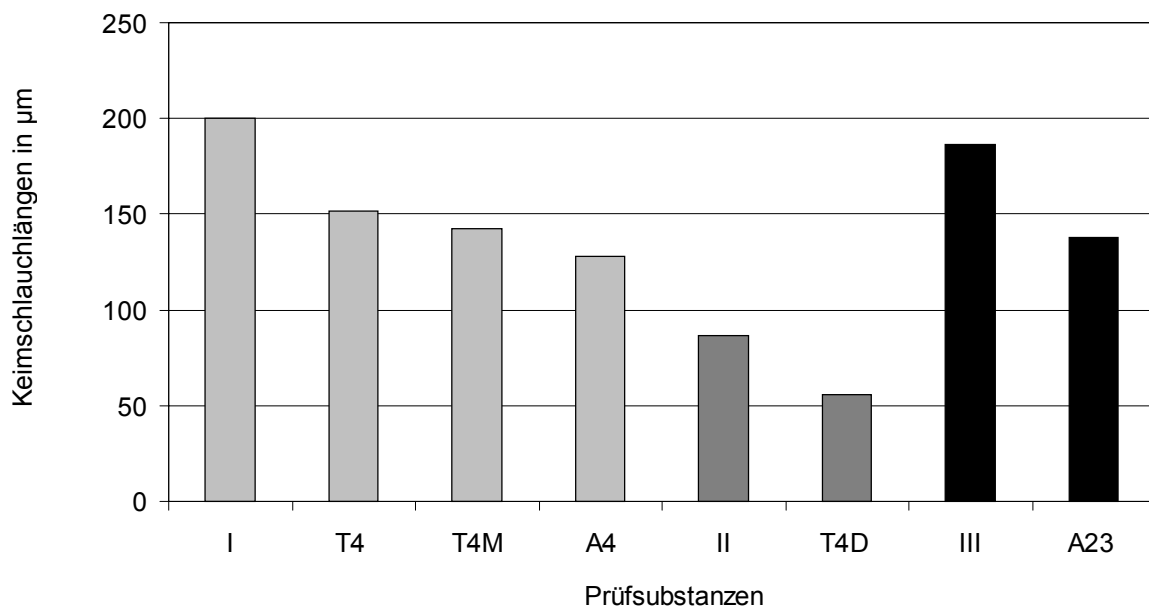
Das T4-Lysozym (T4-Lys) und die Peptide waren in unterschiedlichen Puffern gelöst. Während das Peptid A4, die Lysozym-Mutante (T4M) und das T4-Lys in PBS-Puffer gelöst waren, mußte dem hitzedenaturierten Lysozym (T4D) DMSO zugesetzt werden, um das ausgefallene Protein wieder zu lösen. Das Peptid A23 konnte in einem Gemisch aus PBS, DMSO und Triton gelöst werden. Die unterschiedlichen Lösungsmittel bedingten für den Versuchsaufbau die in Abbildung 15 angegebenen, zusätzlichen Kontrollen.

In sechs Einzeluntersuchungen wurde die Wirkung der Substanzen auf das Keimschlauchlängenwachstum von *P. nicotianae* Zoosporen untersucht. Bei jeder Auswertung wurden nach 20 Stunden die Längen von 40 zufällig ausgewählten Keimhyphen mikroskopisch gemessen. Abbildung 15 zeigt, daß eine Konzentration von 0,5 µg je µl T4-Lysozym einen deutlichen Effekt auf das Wachstum der keimenden Zoosporen hatte. Die gleiche Wirkung war auch bei der Lysozym-Mutante sowie bei den Peptiden A4 und A23 zu beobachten. Auch das denaturierte Lysozym, das keine Enzymfunktion mehr besaß, bewirkte eine vergleichbar hohe Verringerung der durchschnittlichen Keimschlauchlängen wie das T4-Lys. Eine eventuelle Enzymwirkung z.B. als Chitinase konnte somit als Ursache der Wirkung des Lysozyms auf die Zoosporen von *P. nicotianae* ausgeschlossen werden.





**Abb. 15:** Wirkung verschiedener Substanzen auf das Längenwachstum keimender Zoosporen von *Phytophthora nicotianae* bei einer Konzentration von 0,5 µg/l; Auswertung nach 20 Stunden (T4=T4-Lysozym, T4M=T4-Lysozym-Mutante, T4D=hitzenedenaturiertes T4-Lysozym, A4=Peptid A4, A23=Peptid A23, Kontrollen: I = 1xPBS-Puffer (T4-Lys, A4, T4M); II = PBS+DMSO (T4D); III = PBS/DMSO/Triton (A23)).



**Abb. 16:** Wirkung verschiedener Substanzen auf das Längenwachstum keimender Konidien von *Fusarium oxysporum* bei einer Konzentration von 0,5 µg/l; Auswertung nach 7 Stunden (T4=T4-Lysozym, T4M=T4-Lysozym-Mutante, T4D=hitzenedenaturiertes T4-Lysozym, A4=Peptid A4, A23=Peptid A23, Kontrollen: I = 1xPBS-Puffer (T4-Lys, A4, T4M); II = PBS+DMSO (T4D); III = PBS/DMSO/Triton (A23)).

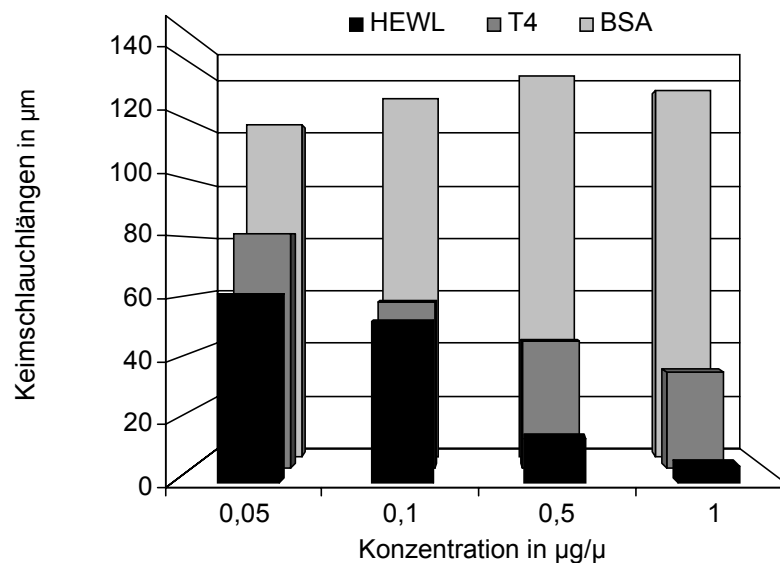
Weitere vergleichende Untersuchungen wurden mit dem Pathogen *Fusarium oxysporum* durchgeführt. Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse entsprechen im wesentlichen den oben gezeigten Ergebnissen mit *P. nicotianae*. Alle getesteten Substanzen zeigten bei einer Konzentration von 0,5 µg je µl eine Wirkung auf die Keimschlauchbildung der Konidien. Die gebildeten Keimhyphen waren nach 7 Stunden im Mittel um 25 bis 30 % kürzer als in den entsprechenden Kontrollen.

Mit den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß Lysozyme und die im T4-Lysozym enthaltenen Peptide A4 und A23 eine hemmende Wirkung auf das Keimschlauchlängenwachstum von *F. oxysporum* und *P. nicotianae* haben. Für Untersuchungen mit dem wichtigen Kartoffelpathogen *P. infestans* mußten die Versuchsbedingungen geändert werden. Da Zoosporen von *P. infestans* in den meisten gängigen Puffern nicht keimten, wurde ein von Woloshuk und Mitarbeitern (1991) speziell für diesen Pathogen entwickelter Puffer (hier A1 genannt) verwendet. Zudem keimten die Zoosporen des Pilzes nur zu einem geringen Prozentsatz auf Wasseragar. Daher erfolgte die Keimung der Zoosporen in einem Wassertropfen, der auf einem Objektträger gesetzt wurde. Zur Inkubation wurde dieser Objektträger für 14 Stunden in einer Feuchtebox gelagert.

Neben T4-Lysozym wurden in dieser Testreihe auch Hühnereiweißlysozym und als Kontrolle Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Alle Substanzen waren in A1-Puffer gelöst. Ferner wurden zur Überprüfung der Wirkung vier Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,5 und 1,0 µg / µl) der Lysozyme getestet.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung vier unabhängig voneinander durchgeführter Tests. Zu erkennen ist, daß das als Proteinkontrolle verwendete BSA bei allen Konzentrationen keinen hemmenden Effekt auf das Keimschlauchwachstum von *P. infestans* Zoosporen hatte. Die Längen der gebildeten Keimhyphen lagen bei allen Konzentrationen zwischen 120 und 140 µm. Zudem waren keine Unterschiede zwischen den Varianten mit BSA und den Pufferkontrollen (nicht dargestellt) zu erkennen.

Für die Wirkung von T4-Lysozym und HEWL waren deutliche Konzentrationsabhängigkeiten zu beobachten. Mit steigender Konzentration des Proteins in der Lösung nahm die durchschnittliche Länge der gebildeten Keimschläuche immer weiter ab. Bereits eine Konzentration von 0,05 µg / µl bewirkte eine Hemmung der Hyphenbildung um ca. 30 % bei T4-Lys und ca. 50 % bei HEWL. Bei Zugabe von 1,0 µg / µl Protein waren die Keimschläuche im Vergleich zur BSA-Kontrolle sehr stark verkürzt. Die durchschnittlichen Längen der Keimhyphen betrugen bei dieser Konzentration im Mittel der vier Versuche 5,6 µm für HEWL, 33,7 µm für T4-Lys und 134,0 µm für Rinderserumalbumin.



**Abb. 17: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Hühnereiweißlysozym (HEWL), T4-Lysozym (T4) und Rinderserumalbumin (BSA, Kontrolle) auf das Keimschlauchwachstum von Zoosporen des Pilzes *Phytophthora infestans*; Keimschlauchlängen gemessen nach 14 Stunden.**

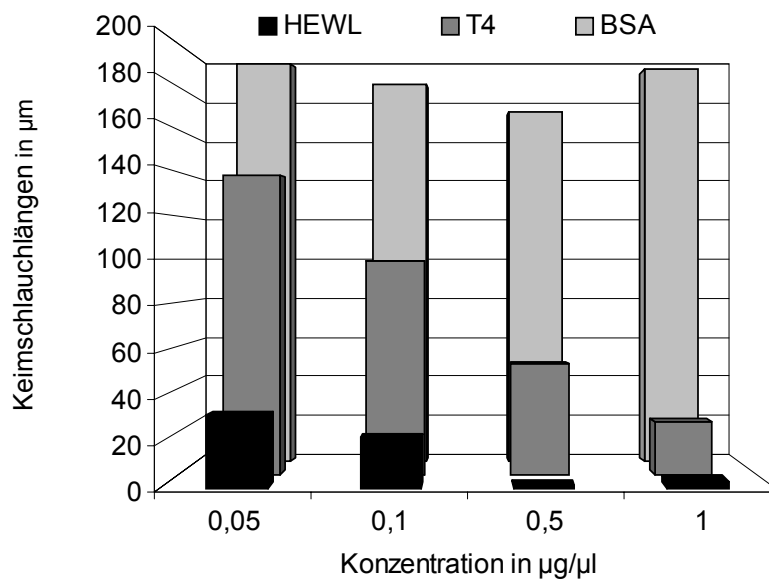
Mikroskopisch war die Wirkung des Lysozyms auf den Pilz deutlich zu erkennen. Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  BSA keimten die enzystierten Zoosporen von *P. infestans* mit einem deutlich ausgeprägten Keimschlauch (Abb. 18). Die Zugabe der gleichen Menge T4-Lys hingegen führte zu einem stark verlangsamten Keimungsprozeß. Während innerhalb von fünf Stunden normalerweise mehrere Mikrometer lange Keimhyphen gebildet wurden, befanden sich Zoosporen, die mit Lysozym behandelt wurden, zu diesem Zeitpunkt erst im Anfangsstadium der Keimung.

Keimschlauchlängentests mit Konidien des Erregers *Alternaria solani* wurden unter den gleichen Bedingungen wie mit Zoosporen von *P. infestans* durchgeführt. Abbildung 19 zeigt, daß auch die dickwandigen Sporen dieses Pilzes nach 20stündiger Inkubation durch die Zugabe von HEWL und T4-Lys deutliche Veränderungen in ihrem Keimverhalten aufwiesen. Mit steigender Lysozymkonzentration verringerte sich die mittlere Länge der Keimhyphen. Wie schon bei *P. infestans* konnte auch hier kein Einfluß des Kontrollproteins BSA festgestellt werden. Ferner lag auch in dieser Versuchsreihe die Wirksamkeit des T4-Lys bei niedrigen Konzentrationen unterhalb der Wirksamkeit des HEWL.



**Abb. 18: Keimende Zoosporen von *Phytophthora infestans* nach Zugabe von 1 µg je µl T4-Lysozym (links) bzw. BSA (rechts) nach 5 Stunden.**

Ein sehr ähnliches Bild wie *P. infestans* Zoosporen zeigten *F. oxysporum* Konidien nach Behandlung mit BSA, T4-Lys bzw. Peptid A4. In der Abbildung 20 ist zu erkennen, daß Mikrokonidien dieses Pilzes in der BSA-Kontrolle (links) nach sieben Stunden mit lang ausgeprägten Hyphen keimten. Eine Konzentration von 1 µg / µl T4-Lys bewirkte eine vollständige Keimhemmung bis zu diesem Zeitpunkt. Die Konidien wiesen keine äußerlich sichtbaren Schädigungen auf, begannen jedoch nicht mit dem Keimungsprozeß. Durch die Zugabe des Peptids A4 verringerte sich die Keimrate der Konidien auf weniger als 10 %. Zudem wiesen Konidien, die nach sieben Stunden gekeimt waren, deutliche morphologische Veränderungen der Keimschläuche auf. Die gebildeten Hyphen waren stark verzweigt und im Vergleich zur BSA-Kontrolle sichtbar verkürzt.



**Abb. 19:** Einfluß verschiedener Konzentrationen von Hühnereiweißlysozym (HEWL), T4-Lysozym (T4) und Rinderserumalbumin (BSA, Kontrolle) auf das Keimschlauchwachstum von Konidien des Pilzes *Alternaria solani*; Keimschlauchlängen gemessen nach 20 Stunden.



**Abb. 20:** Keimende Mikrokonidien von *Fusarium oxysporum* nach 7 Stunden in 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  BSA (links), T4-Lys (Mitte) und Peptid A4 (rechts).

Um die Wirkung von Lysozymen auf einen weiteren wichtigen phytopathogenen Pilz zu überprüfen, wurden Untersuchungen mit *B. cinerea* durchgeführt. Abbildung 21 zeigt mikroskopische Aufnahmen keimender Konidien dieses Pilzes in Wasser und Lösungen mit 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  BSA, HEWL bzw. T4-Lys. Dabei zeigte sich, wie bereits in den vorangegangenen Tests beobachtet wurde, daß das als Proteinkontrolle verwendete BSA im Vergleich zur Wasserkontrolle keinen Einfluß auf die Keimung der Konidien hatte. Sowohl in Wasser als auch in der BSA-Lösung keimte ein großer Prozentsatz der Sporen nach 20stündiger

Inkubation. Dagegen konnte bei Konidien, die mit HEWL bzw. T4-Lys behandelt worden waren, keine Bildung von Keimhyphen beobachtet werden.

Bei Betrachtung des Versuchs nach ca. 48 Stunden war jedoch zu erkennen, daß auch die mit Lysozym behandelten Konidien Keimhyphen gebildet hatten. Zu diesem Zeitpunkt waren keine deutlichen Unterschiede mehr zwischen den vier Versuchsvarianten festzustellen. Möglicherweise wurden die Proteine von Proteasen, die vom Pilz sekretiert wurden, abgebaut.



**Abb. 21:** Keimende Konidien von *Botrytis cinerea* nach 20 Stunden in demineralisiertem Wasser (A.d.), 1 µg / µl Rinderserumalbumin (BSA), Hühnereiweißlysozym (HEWL) bzw. T4-Lysozym (T4-Lys).

Auch die Wirkung von HEWL, T4-Lys und A4 auf keimende Ascosporen von *Sclerotinia sclerotiorum* wurde überprüft. Die Zugabe dieser Stoffe bis zu einer Konzentration von 1 µg / µl führte zu keiner meßbaren Hemmung des Pilzwachstums.

Für die Pathogene *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* und *Phytophthora infestans* bzw. *P. nicotianae* konnte somit eine nicht-enzymatische Wirkung von Hühnereiweißlysozym, T4-Lysozym und des Peptids A4 auf das Keimschlauchlängenwachstum festgestellt werden. Für *P. infestans* und *A. solani* wurden Proteinkonzentrationen zwischen 0,05 und 1,0 µg / µl getestet, wobei eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Konzentration der Proteine und dem Wirkungsgrad beobachtet wurde. Unter den getesteten Erregern

bildete *Sclerotinia sclerotiorum* eine Ausnahme. Ascosporen dieses Pilzes zeigten kein verringertes Wachstum nach Behandlung mit den Proteinen.

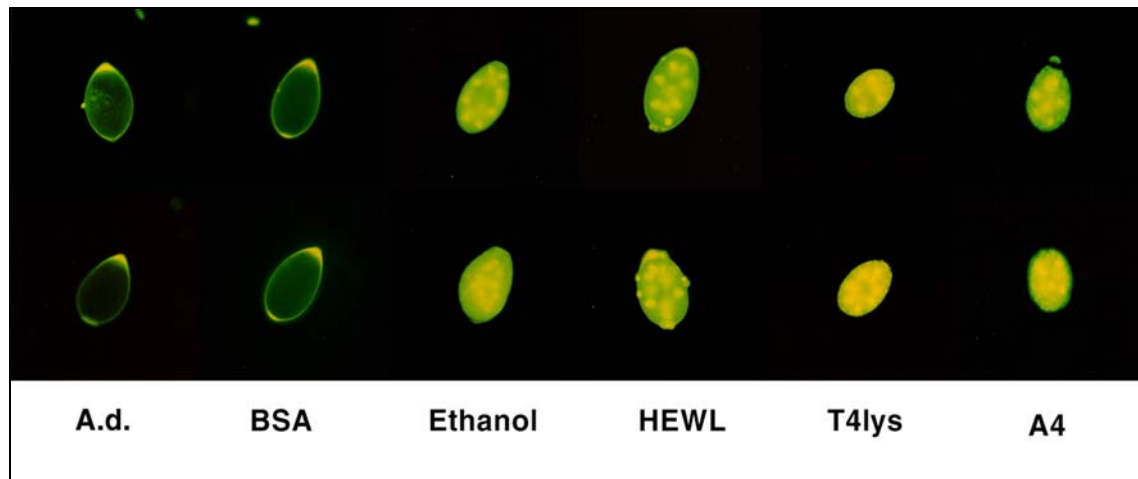
#### 4.2.2 Sytox-Färbetest

Mit Hilfe einer 3D-Proteinsequenzanalyse konnten Düring und Mitarbeiter (1999) mehrere amphipathische Helices in der Struktur des T4-Lysozyms identifizieren. Da solche Helices häufig Interaktionen mit Zellmembranen eingehen können, sollte zur genaueren Aufklärung der Wirkungsweise von Lysozymen auf Pilze die Aktivität der Lysozyme auf pilzliche Membranen überprüft werden. Ein Färbetest nach Reed und Mitarbeiter (1997) verwendet den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX, der nicht membranpermeabel ist, zum Nachweis der Lebensfähigkeit von pilzlichen Zellen. Dieser Test wurde hier zur Überprüfung der Wirkung von Lysozymen auf Sporangien von *P. infestans* verwendet.

Nach dreistündiger Inkubation mit BSA bzw. Wasser und anschließender Anfärbung zeigten die Sporangien nur eine geringe Fluoreszenz im Bereich der Sporangienzellwand (Abb. 22). Deutlich ist zu erkennen, daß das Innere der Sporangien ungefärbt blieb. Als Positivkontrolle wurden Sporangien nach der dreistündigen Inkubation für zehn Minuten mit 70prozentigem Ethanol behandelt und dadurch abgetötet. Abbildung 22 zeigt, daß der Farbstoff in das Innere der Sporen eindringen konnte und es leuchtend grün-gelb färbte. Besonders deutlich zu erkennen sind auch die Zellkerne, die durch den Nukleinsäurefarbstoff intensiv gelb fluoreszieren. Die gleiche helle Färbung im Zellinneren wie bei den abgetöteten Sporangien war auch bei Sporangien zu sehen, die mit 3 µg / µl Hühnereiweißlysozym, T4-Lysozym bzw. dem Peptid A4 inkubiert wurden.

Durch die Anfärbung mit dem Farbstoff SYTOX konnte somit gezeigt werden, daß sowohl die Lysozyme als auch das Peptid A4 den Aufbau bzw. die Funktion der pilzlichen Zellmembranen beeinträchtigen. Das Eindringen des Farbstoffs in das Zellinnere war bei Sporangien mit intakter Membran wie bei den Kontrollen BSA und Wasser nicht möglich. Nach Behandlung mit HEWL, T4-Lysozym bzw. A4 waren die Zellmembranen jedoch für den Nukleinsäurefarbstoff durchlässig, und die Sporangien fluoreszierten leuchtend gelb.

Das Peptid A23 konnte nicht in die Untersuchungen einbezogen werden, da es nur durch Zugabe von Triton und DMSO löslich war. Beide Stoffe beeinflussen die Permeabilität von Zellmembranen, so daß Aussagen über die Wirkung des Peptids nicht eindeutig gewesen wären.



**Abb. 22:** *Phytophthora infestans* Sporangien nach dreistündiger Inkubation in demineralisiertem Wasser (A.d.), Rinderserumalbumin (BSA), Hühnereiweißlysozym (HEWL), T4-Lysozym (T4lys) bzw. Peptid A4 und nach 10 minütiger Inkubation mit Ethanol; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Färbung mit SYTOX. Sporangien mit geschädigten Zellmembranen fluoreszieren leuchtend gelb.

### 4.3 Antimikrobielle Wirkung des Lysozyms *in planta*

#### 4.3.1 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Désirée

Für Resistenzuntersuchungen an transgenen Lysozym-Kartoffeln wurden Pflanzen aus Knollen in einem klimatisierten Gewächshaus angezogen. Nach Anbau von jeweils zehn Pflanzen einer Linie wurden Blattproben vom 4-Blatt-Stadium bis zur Blütenbildung entnommen. Wichtige Voraussetzung bei der Entnahme war, von diesen Pflanzen gleichmäßig entwickeltes Blattmaterial der gleichen Blattetage zu ernten.

Einige der transgenen Linien wiesen phänotypische Veränderungen auf. So konnte die Linie DL15 nicht mit in die Versuche einbezogen werden, da diese Pflanzen stark verringertes Wachstum aufwiesen und kaum Knollen bildeten. Pflanzen dieser Linie bildeten zudem nur sehr kleine Fiederblätter, so daß nicht ausreichend Blattmaterial für Blattscheibentests entnommen werden konnte.

Leicht verändertes Wachstum zeigte auch die Linie DL4. Pflanzen dieser Linie liefen verzögert auf und wuchsen etwas langsamer. Die Knollenbildung hingegen war mit anderen Linien vergleichbar. Phänotypische Veränderungen wies auch die Linie DL11 auf. Leicht gestauchtes Längenwachstum bei gleicher Blattanzahl wie Désirée waren typische Merkmale dieser Linie. Zusätzlich konnte an Pflanzen der Linie DL11 eine Blüten deformation, die zu unvollständig entwickelten Blüten führte, beobachtet werden.



Alle anderen hier verwendeten transgenen Kartoffellinien unterschieden sich in Wachstum, Blüten- und Knollenbildung nicht von der Sorte Désirée und zeigten ein für Gewächshausanbau typisches Aussehen.

Für alle Resistenzuntersuchungen mit transgenen Lysozym-Kartoffeln wurden zwei Kontrollen verwendet. Einerseits die Ausgangssorte Désirée als nicht-transgene Kontrolle, die aber ebenfalls aus einer Sterilkultur stammte. Und andererseits die Linie DK1, die nur das Kanamycinresistenzgen *nptII* unter Kontrolle des Nopalinsynthase-Promotors exprierte, nicht jedoch das Lysozym.

Alle Resistenztests wurden in Form von Blattscheibentests durchgeführt. Die Inokulation mit *P. infestans* erfolgte mit frischen, von infizierten Blättern geernteten Sporangien, die durch einen Kältereiz zum Zoosporenschlupf angeregt waren. Jede Blattscheibe wurde mit einem 20 µl-Tropfen Sporensuspension beimpft, in dem sich ca. 200 Sporangien befanden. Nach Inkubation bei 17/10 °C wurden Bonituren am fünften und sechsten Tag nach der Inokulation durchgeführt.

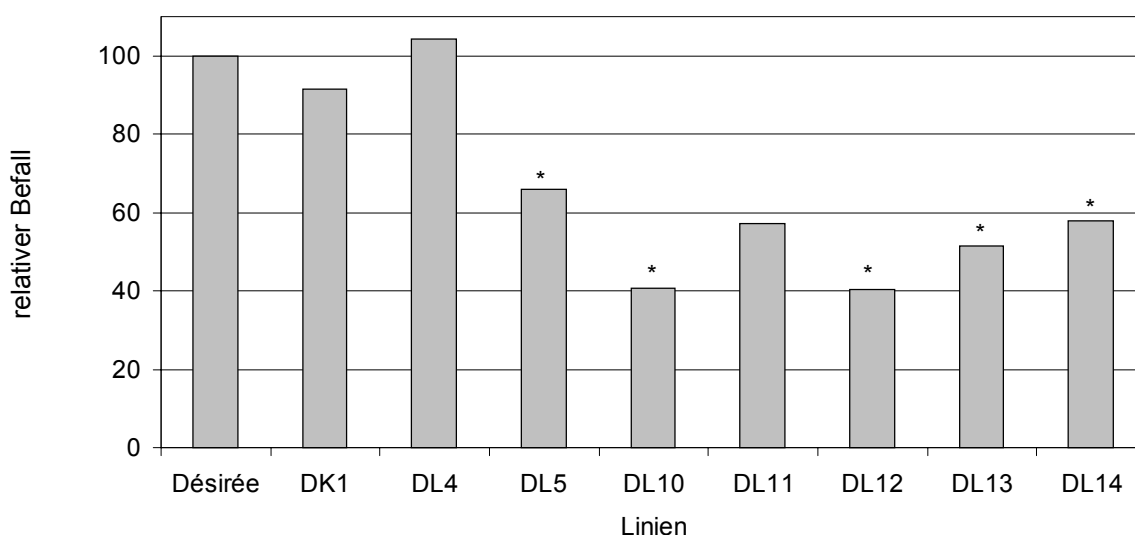
Die Ergebnisse von 13 unabhängig voneinander durchgeführten Tests sind in Tabelle 9 dargestellt. In den Versuchen Nr. 4 und Nr. 5 konnte die Linie DL4 wegen stark verzögerten Auflaufens nicht berücksichtigt werden. Befallsunterschiede wären bei Verwendung dieser Pflanzen im Blattscheibentests wahrscheinlich auf das unterschiedliche Pflanzenalter zurückzuführen gewesen. In Versuch Nr. 13 wurde die Linie DL14 nicht angebaut.

**Tab. 9: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Phytophthora infestans* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien der Sorte Désirée; Befallsmittelwerte 13 unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Désirée, n.u.=nicht untersucht).**

| Versuch Nr. | Désirée | DK1  | DL4   | DL5  | DL10 | DL11 | DL12 | DL13 | DL14 |
|-------------|---------|------|-------|------|------|------|------|------|------|
| 1           | 56,3    | 50,9 | 20,0  | 24,5 | 1,7  | 3,7  | 6,4  | 6,0  | 5,6  |
| 2           | 68,6    | 59,8 | 73,8  | 21,1 | 19,2 | 11,3 | 36,1 | 90,5 | 91,6 |
| 3           | 35,2    | 33,4 | 82,5  | 29,1 | 20,0 | 49,5 | 33,1 | 13,6 | 23,0 |
| 4           | 29,0    | 25,0 | n.u.  | 21,5 | 2,8  | 11,6 | 5,7  | 14,5 | 7,4  |
| 5           | 26,0    | 22,8 | n.u.  | 8,5  | 3,8  | 7,0  | 0,2  | 3,6  | 2,5  |
| 6           | 28,1    | 21,1 | 27,7  | 16,3 | 7,0  | 10,8 | 8,4  | 5,2  | 8,4  |
| 7           | 15,4    | 12,7 | 28,6  | 7,6  | 6,8  | 4,6  | 8,2  | 2,0  | 7,8  |
| 8           | 32,4    | 31,4 | 36,0  | 27,0 | 7,9  | 18,8 | 3,5  | 9,6  | 11,1 |
| 9           | 16,3    | 23,2 | 63,0  | 33,5 | 7,0  | 49,3 | 10,9 | 23,3 | 7,2  |
| 10          | 83,2    | 70,9 | 59,8  | 75,0 | 60,2 | 44,7 | 32,1 | 41,0 | 64,8 |
| 11          | 14,4    | 38,0 | 4,6   | 27,8 | 14,1 | 33,1 | 19,4 | 13,4 | 9,5  |
| 12          | 55,6    | 30,8 | 16,9  | 12,8 | 26,7 | 16,6 | 8,8  | 3,8  | 25,6 |
| 13          | 34,5    | 32,1 | 24,1  | 20,7 | 25,0 | 22,5 | 27,0 | 28,9 | n.u. |
| Mw.         | 38,1    | 34,8 | 39,7  | 25,0 | 15,5 | 21,8 | 15,4 | 19,7 | 22,0 |
| relativ     | 100     | 91,4 | 104,4 | 65,8 | 40,8 | 57,3 | 40,4 | 51,6 | 57,9 |

Die in Abbildung 23 dargestellten Befallsmittelwerte zeigen, daß keine deutlichen Unterschiede zwischen Désirée und der transgenen Kontrolle DK1 im Befall mit *P. infestans* bestanden. Die alleinige Anwesenheit des nptII-Gens in Kartoffelpflanzen hatte keine Wirkung auf den Befall mit dem Erreger. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um Aussagen über die Wirkung des Lysozyms *in planta* machen zu können.

Die Linie DL4 wies keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf. Anders als bei allen anderen Linien ist keine Befallsreduktion, sondern eher eine Tendenz zu höherer Anfälligkeit zu erkennen. Diese ist wahrscheinlich auf das veränderte Wachstumsverhalten dieser Pflanzen und den damit verbundenen physiologischen Altersunterschieden der Blätter zu den anderen Linien zurückzuführen.



**Abb. 23: Relativer Befall transgener Lysozym-Kartoffellinien mit *Phytophthora infestans* im Verhältnis zu Désirée; Mittelwerte aus 14 Resistenztests. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant zu Désirée und DK1 (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).**

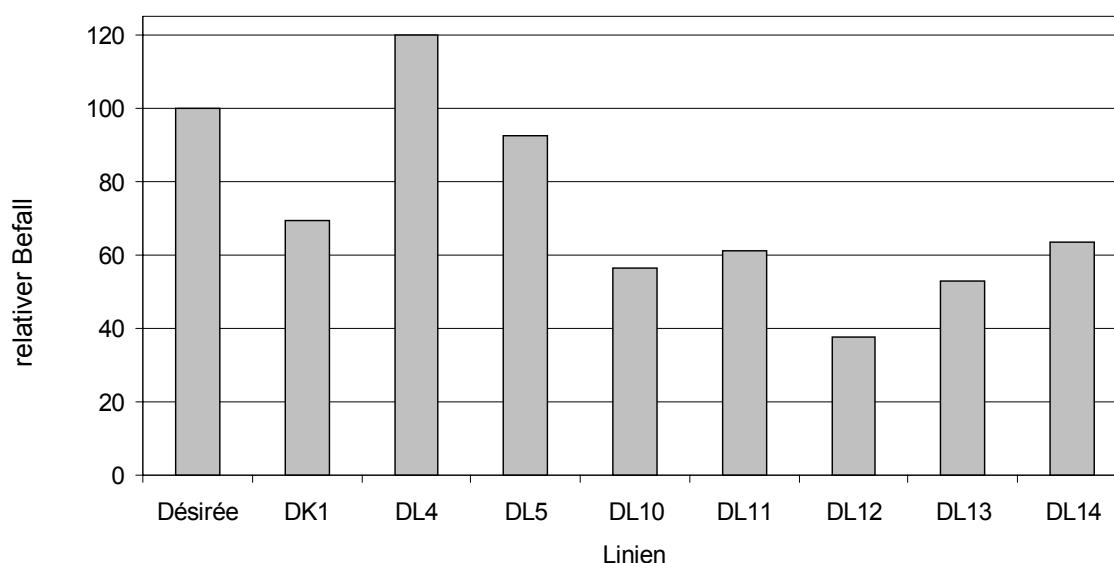
Neben der Linie DL4 zeigte auch die Linie DL11 phänotypische Veränderungen. Zwar war diese Linie im Mittel der Versuche um ca. 43 % weniger stark befallen, es traten aber starke Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchsmittelwerten auf. Bei der statistischen Verrechnung im Wilcoxon-Test wies DL11 daher, vergleichbar mit der Linie DL4, keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen Désirée und DK1 auf.

Alle anderen Linien waren signifikant verschieden sowohl zu Désirée als auch zur transgenen Kontrolle. Die Befallsreduktionen der Linien DL5, DL13 und DL14 im Verhältnis zu Désirée betrugen 34,2 %, 48,4 % bzw. 42,1 %. Noch höhere Resistenzniveaus wiesen die Linien DL10 und DL12 auf. Mit jeweils ca. 60 % verringertem Befall im Vergleich zu Désirée zeigten diese Linien in allen Untersuchungen stark verringerten Befall mit *P. infestans*.

Vergleichende Untersuchungen zur Resistenz transgener, Lysozym-exprimierender Kartoffeln wurden auch mit dem Blattpathogen *Alternaria solani* durchgeführt. Die Mittelwerte von vier unabhängigen Befallsversuchen sind in Tabelle 10 dargestellt. Anhand der prozentualen Mittelwerte im Verhältnis zu Désirée (Abbildung 24) ist zu erkennen, daß einige der DL-Linien auch verstärkte quantitative Resistenzen gegenüber *A. solani* aufweisen.

**Tab. 10: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Alternaria solani* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien der Sorte Désirée; Befallsmittelwerte vier unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Désirée, n.u.=nicht untersucht).**

|                | Désirée      | DK1         | DL4          | DL5         | DL10        | DL11        | DL12        | DL13        | DL14        |
|----------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>1</b>       | 75,4         | 58,9        | 100,0        | 71,1        | 55,5        | 53,1        | 36,0        | 43,4        | 45,2        |
| <b>2</b>       | 5,3          | 6,5         | 12,2         | 3,5         | 0,8         | 3,7         | 0,6         | 0,8         | 1,4         |
| <b>3</b>       | 21,3         | 2,2         | 1,3          | 2,0         | 0,9         | 0,5         | 2,1         | 3,0         | 8,1         |
| <b>4</b>       | 13,2         | 12,3        | 24,5         | 29,8        | 7,8         | 13,3        | 4,8         | 13,9        | n.u.        |
| <b>Mw</b>      | <b>28,8</b>  | <b>20,0</b> | <b>34,5</b>  | <b>26,6</b> | <b>16,3</b> | <b>17,6</b> | <b>10,9</b> | <b>15,3</b> | <b>18,2</b> |
| <b>relativ</b> | <b>100,0</b> | <b>69,4</b> | <b>119,8</b> | <b>92,3</b> | <b>56,5</b> | <b>61,3</b> | <b>37,8</b> | <b>53,0</b> | <b>63,3</b> |



**Abb. 24: Relativer Befall transgener Lysozym-Kartoffellinien mit *Alternaria solani* im Verhältnis zu Désirée; Mittelwerte aus vier Resistenztests.**

Die Ergebnisse wiesen deutliche Ähnlichkeiten mit den *Phytophthora*-Befallstests auf. Der durchschnittliche Befall der Linie DL4 lag hier ebenfalls höher als bei der Kontrolle. Zudem waren auch nach Infektion mit *A. solani* die Linien DL10, DL12 und DL13 am geringsten befallen. Wegen eines abweichenden Ergebnisses in Versuch Nr. 3 lag der Befallsmittelwert der transgenen Kontrolle DK1 deutlich unterhalb des Wertes von Désirée. Aufgrund der

geringen Wiederholungszahl der Versuche bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Linien und den Kontrollen Désirée und DK1.

Anhand einer Reihe von Resistenzuntersuchungen konnte somit gezeigt werden, daß transgene, Lysozym-exprimierende Kartoffellinien deutlich verstärkte quantitative Resistenz gegenüber den Pathogenen *P. infestans* und *A. solani* aufweisen. Mit Befallsreduktionen zwischen 34,2 und 59,6 % zeigten sieben der neun untersuchten Linien gute bis sehr gute Resistenzniveaus gegenüber *P. infestans*. Zwei der transgenen Linien wiesen phänotypische Veränderungen auf und waren im Mittel der Versuche nicht signifikant verschieden von Désirée.

In Befallstests mit *A. solani* waren die getesteten Linien nicht signifikant voneinander verschieden. Trotz der geringen Zahl der Versuche deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, daß Lysozym-exprimierende Kartoffeln auch verstärkte Resistenz gegen diesen Erreger aufweisen. Es bestand eine starke Korrelation von 0,94 zwischen den Befallsversuchen mit *P. infestans* und *A. solani*.

#### **4.3.2 Lysozym exprimierende Kartoffellinien mit Mannopinsynthese-Promotor**

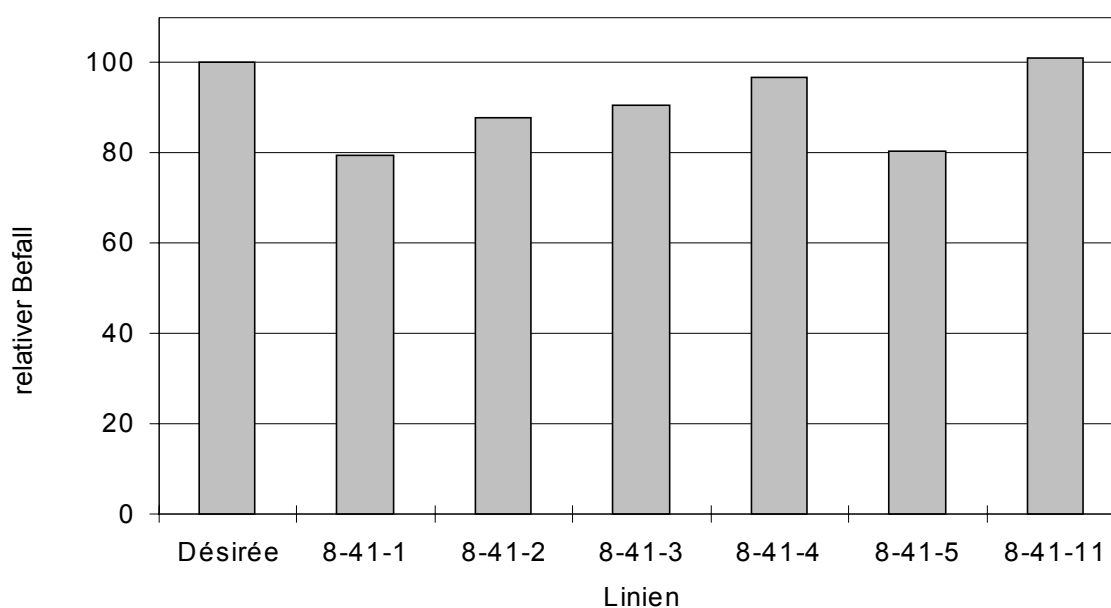
Auf ihr Resistenzniveau gegenüber *P. infestans* wurden nicht nur die DL-Linien überprüft, die das Lysozym unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, sondern auch die ebenfalls aus Désirée hergestellten Linien mit dem Konstrukt pSR 8-41. Bei diesen Linien stand das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des wund- und hormoninduzierbaren Mannopinsynthese-Promotors aus *A. tumefaciens*.

Sechs dieser Linien wurden im Gewächshaus angebaut und in zehn unabhängigen Befallstests geprüft (Tab. 11). Keine der Pflanzen zeigte Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild oder Abweichung im Pflanzenwuchs bzw. in der Knollenbildung.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Blattscheibentests nach Inokulation mit *P. infestans*. Die sechs transgenen Linien wiesen im Vergleich zu Désirée nur schwach verringerte Befallswerte auf. Die Befallsreduktionen von drei Linien lagen zwischen ca. 10 und 20 %. Die Linien 8-41-4 und 8-41-11 zeigten keine Befallsunterschiede im Vergleich zu Désirée. Auch die statistische Verrechnung der Befallsmittelwerte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sorte Désirée und den transgenen Linien.

**Tab. 11:** Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Befallstests mit *Phytophthora infestans* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien mit dem Mannopinsynthese-Promotor; Befallsmittelwerte zehn unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Désirée).

| Versuch Nr. | Désirée | 8-41-1 | 8-41-2 | 8-41-3 | 8-41-4 | 8-41-5 | 8-41-11 |
|-------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1           | 6,4     | 13,2   | 8,6    | 8,2    | 12,9   | 12,0   | 35,2    |
| 2           | 26,0    | 17,0   | 17,1   | 21,1   | 15,2   | 11,8   | 10,5    |
| 3           | 28,1    | 27,9   | 37,5   | 35,9   | 41,3   | 38,9   | 40,5    |
| 4           | 20,5    | 21,6   | 17,4   | 19,5   | 18,0   | 17,2   | 23,8    |
| 5           | 27,0    | 23,3   | 38,9   | 18,9   | 27,3   | 7,0    | 19,7    |
| 6           | 15,8    | 12,5   | 19,4   | 20,0   | 19,4   | 15,2   | 13,3    |
| 7           | 19,9    | 25,8   | 28,3   | 27,0   | 19,4   | 26,7   | 27,2    |
| 8           | 7,7     | 3,6    | 8,1    | 3,4    | 6,3    | 4,5    | 5,4     |
| 9           | 69,8    | 28,6   | 21,6   | 42,2   | 49,2   | 38,5   | 46,1    |
| 10          | 33,0    | 28,8   | 26,7   | 33,8   | 37,2   | 32,7   | 35,6    |
| Mw.         | 25,4    | 20,2   | 22,4   | 23,0   | 24,6   | 20,4   | 25,7    |
| relativ     | 100,0   | 79,5   | 87,9   | 90,5   | 96,9   | 80,4   | 101,2   |

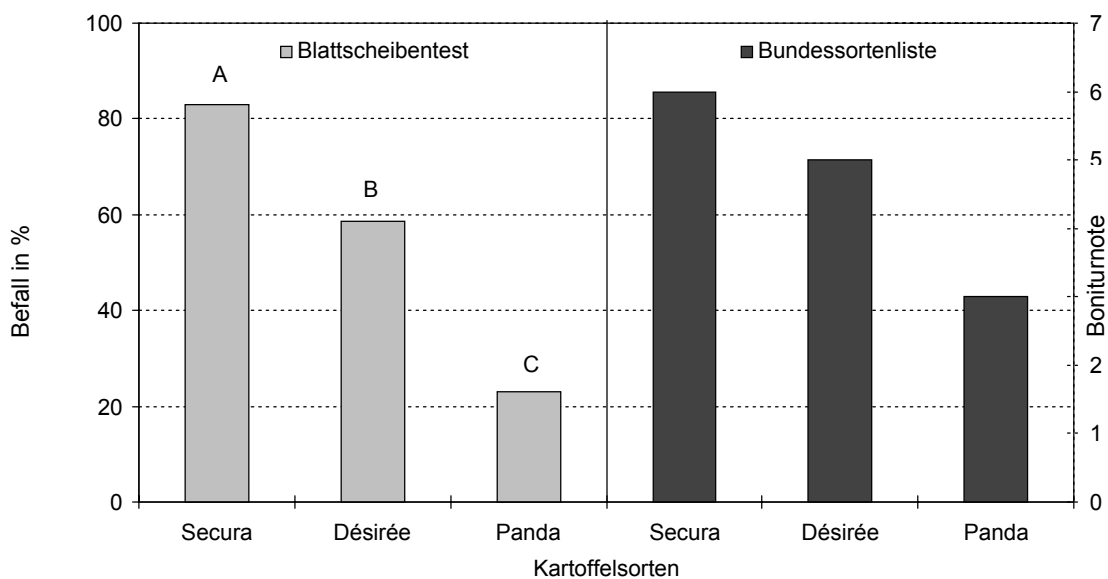


**Abb. 25:** Relativer Befall mit *Phytophthora infestans* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien mit dem Mannopinsynthese-Promotor im Verhältnis zu Désirée; Mittelwerte aus 10 Resistenztests.

#### 4.3.3 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Secura

Das T4-Lysozym-Gen wurde von Düring und Mitarbeitern nicht nur in die Kartoffelsorte Désirée, sondern auch in die Speisesorte Secura und die Wirtschaftssorte Panda transformiert. Die beiden Sorten unterscheiden sich laut Beschreibender Sortenliste

(Bundessortenamt, 1998) deutlich hinsichtlich ihrer Feldresistenz gegenüber *P. infestans*. Während Panda starke Resistenzen gegen den Erreger zeigt, ist Secura deutlich anfälliger als Désirée. Diese Resistenzunterschiede zwischen den Sorten konnten auch mit Hilfe des Blattscheibentests reproduziert werden. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis eines *Phytophthora*-Befallstest mit den drei Sorten. Die Befallsunterschiede sind deutlich sichtbar und unterscheiden sich im Mann-Whitney-Test signifikant. Das Ergebnis spiegelt die in der Bundessortenliste angegebenen Boniturnoten für die Anfälligkeit gegenüber Krautfäule wider.



**Abb. 26:** Befallswerte der Sorten Secura, Désirée und Panda mit *Phytophthora infestans* im Blattscheibentest und Boniturnoten für Krautfäule der Beschreibenden Sortenliste (BUNDESSORTENAMT, 1998). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (Mann-Whitney-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Wie bei einigen transgenen DL-Linien der Sorte Désirée wurde das SP-Lysozym und der Promotor bei den Linien der Sorte Secura zusätzlich von zwei MAR-Regionen (Matrix Associated Regions) aus Sojabohne flankiert (BREYNE et al., 1992; PORSCHE et al., 1998).

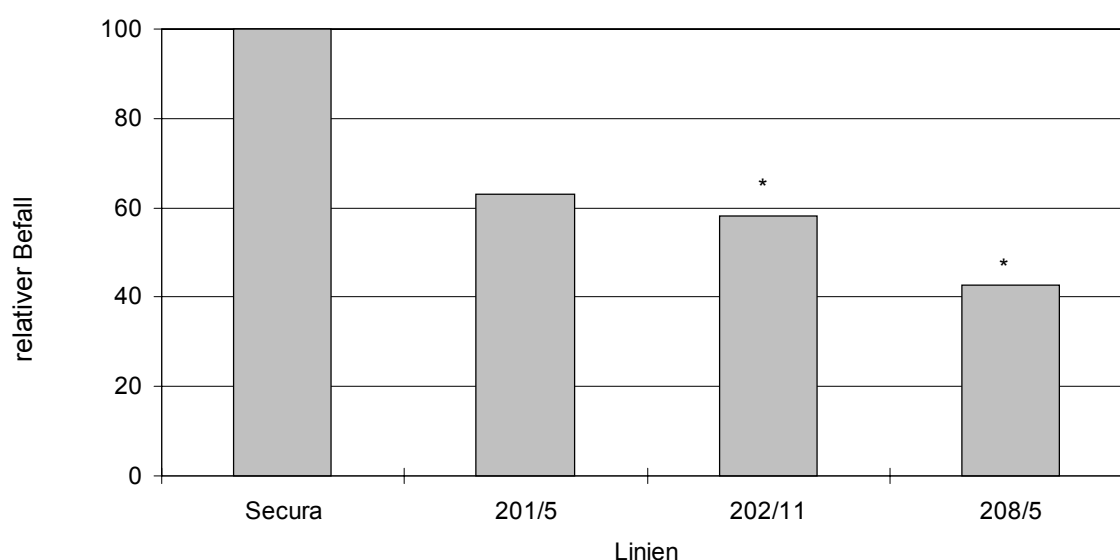
Drei der zur Verfügung stehenden transgenen Secura-Linien wurden auf ihre Resistenz gegenüber *P. infestans* in fünf Blattscheibentests untersucht (Tabelle 12). Da die Anfälligkeit dieser Kartoffelsorte höher war als die der Sorte Désirée, wurden die Bonituren bereits am vierten und fünften Tag nach der Inokulation durchgeführt.

**Tab. 12: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Befallstests mit *Phytophthora infestans* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien der Sorte Secura; Befallsmittelwerte fünf unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Secura).**

| Versuch Nr. | Secura | 201/5 | 202/11 | 208/5 |
|-------------|--------|-------|--------|-------|
| 1           | 14,6   | 5,0   | 11,6   | 7,2   |
| 2           | 40,5   | 9,7   | 7,5    | 12,7  |
| 3           | 22,2   | 12,3  | 14,5   | 8,5   |
| 4           | 16,7   | 31,1  | 14,4   | 12,4  |
| 5           | 26,9   | 18,2  | 22,3   | 10,8  |
| Mw.         | 24,2   | 15,3  | 14,1   | 10,3  |
| relativ     | 100,0  | 63,1  | 58,2   | 42,7  |

Ähnlich wie bei den Désirée-Linien ergaben die *Phytophthora*-Befallstests mit den transgenen Secura-Linien deutlich verringerte Befallswerte im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle Secura (Abb. 27).

Die Linie 201/5 zeigte eine Befallsreduktion von ca. 37 % im Verhältnis zu Secura. Aufgrund eines abweichenden Mittelwertes in Versuch Nr. 4 war der Unterschied zur Kontrolle jedoch nicht signifikant. Mit Befallswerten, die im Vergleich zu Secura um 41,8 bzw. 57,3 % reduziert waren, wiesen die Linien 202/11 und 208/5 signifikante Unterschiede auf (Wilcoxon-Test  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 27: Relativer Befall transgener Lysozym-Kartoffellinien mit *Phytophthora infestans* im Verhältnis zu Secura; Mittelwerte aus fünf Blattscheibentests. Säulen mit \* unterscheiden sich signifikant von Secura (Wilcoxon-Test,  $p \leq 0,05$ ).**

Auch in der wirtschaftlich wichtigeren Kartoffelsorte Secura vermittelte das T4-Lysozym-Gen somit deutlich verbesserte quantitative Resistenz gegen *P. infestans*. Die Höhe der Befallsreduktionen dieser drei Linien im Vergleich zur Kontrolle war mit den Ergebnissen der DL-Linien vergleichbar.

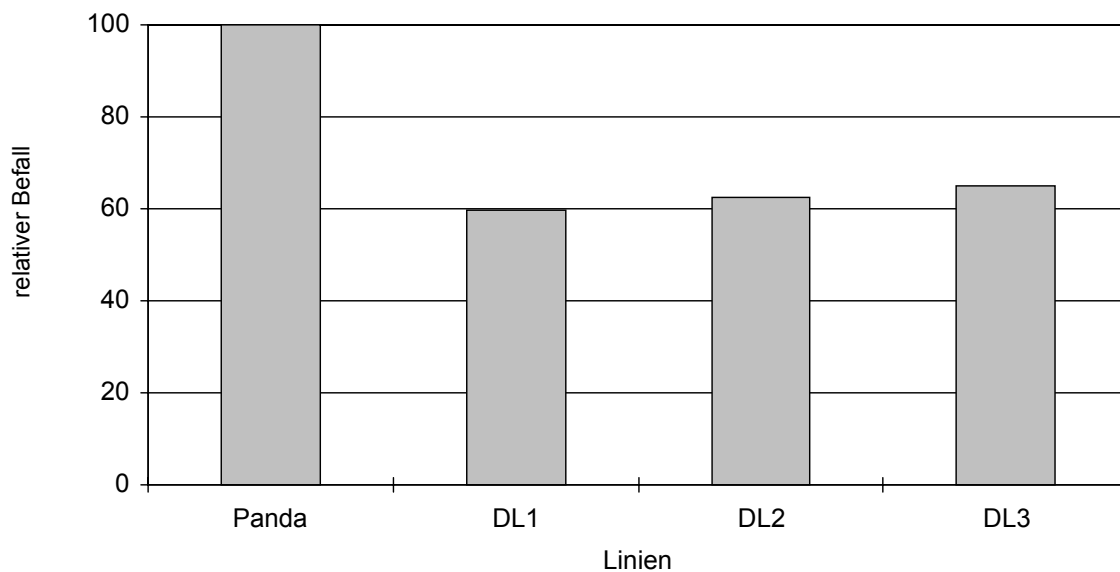
#### 4.3.4 Lysozym exprimierende Kartoffellinien der Sorte Panda

Transgene Panda-Linien wurden mit dem gleichen Konstrukt wie die Désirée-Linien hergestellt und exprimierten das Lysozym konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Zur Bestimmung des Resistenzniveaus drei transgener Panda-Linien im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle wurden vier Versuche durchgeführt. Die Inokulation und die Inkubation mit *P. infestans* erfolgte wie bei den bereits beschriebenen Untersuchungen mit Désirée- und Secura-Linien. Die Bonitur wurde aufgrund der im Vergleich zu Désirée geringeren Anfälligkeit der Sorte Panda am sechsten und am siebten Tag nach der Inokulation durchgeführt. Tabelle 12 und Abbildung 28 zeigen die in den unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelten Befallsergebnisse.

**Tab. 12: Übersichtstabelle zu den Versuchsergebnissen der Blattscheibentests mit *Phytophthora infestans* an transgenen Lysozym-Kartoffellinien der Sorte Panda; Befallsmittelwerte vier unabhängig durchgeführter Blattscheibentests (Mw.=Mittelwert, relativ=Befall relativ zu Panda).**

| Versuch Nr. | 1.1.1.1<br>Pan<br>da | DL1  | DL2  | DL3  |
|-------------|----------------------|------|------|------|
| 1           | 23,1                 | 13,4 | 26,4 | 26,5 |
| 2           | 3,4                  | 2,2  | 0,4  | 3,0  |
| 3           | 13,5                 | 8,8  | 3,9  | 2,9  |
| 4           | 33,3                 | 19,3 | 15,1 | 15,2 |
| Mw.         | 18,3                 | 10,9 | 11,4 | 11,9 |
| relativ     | 100,0                | 59,6 | 62,4 | 65,1 |





**Abb. 28: Relativer Befall transgener Lysozym-Kartoffellinien mit *Phytophthora infestans* im Verhältnis zu Panda; Mittelwerte aus vier Blattscheibentests.**

Aufgrund der hohen natürlichen Resistenz gegen *Phytophthora*-Befall waren bei allen Versuchen die Befallswerte auch sieben Tage nach der Inokulation verhältnismäßig niedrig. Im Mittel der Versuche zeigten die drei transgenen Linien DL1, DL2 und DL3 verbesserte Resistenz gegen den Erreger. Der Befall mit *P. infestans* lag im Verhältnis zu Panda (100 %) bei den T4-Lysozym-exprimierenden Linien zwischen 60 und 65 %. In Abbildung 28 sind die prozentualen Befallswerte veranschaulicht. Eine statistische Verrechnung der Daten wurde aufgrund der geringen Wiederholungszahl der Versuche nicht durchgeführt.

Wie bereits für transgene Linien der Sorten Désirée und Secura gezeigt werden konnte, vermittelte das Lysozymgen unter Kontrolle des 35S-Promotors Resistenz gegen *P. infestans*. Die durchgeführten Resistenztests deuten darauf hin, daß diese Wirkung auch in transgenen Linien der Sorte Panda vorhanden ist. Durch die konstitutive Expression des T4-Lysozyms konnte damit die Anfälligkeit der Kartoffelsorte Panda gegen *Phytophthora*-Befall weiter verringert werden.

## 5 Diskussion

Das Einkreuzen von Resistenzen aus Wildpflanzen in wirtschaftlich wichtige Sorten spielt in der klassischen Pflanzenzüchtung eine bedeutende Rolle. So wird z.B. bereits seit den 30er Jahren die Kulturkartoffel mit der verwandten Wildart *Solanum demissum* gekreuzt, um interessante Resistenzgene in Kultursorten zu übertragen (SCHÖBER-BUTIN, 1998). Daraus resultierten Sorten, die vollständig resistent gegen Befall mit *P. infestans* waren. Da diese Resistenzen jedoch rassenspezifisch und monogen waren, kam es nach einigen Jahren zum „Zusammenbruch“ der Resistenz. Grund dafür sind Mutationen des Pathogens, der einen sehr viel schnelleren Generationszyklus aufweist als die Kulturpflanze. Insbesondere bei der Kartoffel, die wegen ihrer vegetativen Vermehrung eine hohe genetische Einheitlichkeit besitzt, können wirtsspezifische Resistenzen von Pathogenen schnell überwunden werden (DESTÉFANO-BELTRÁN et al., 1991). Damit ist es der Pflanzenzüchtung bisher immer nur für einen begrenzten Zeitraum gelungen, Kultursorten mit hoher Resistenz gegen die jeweils wichtigen Pilzkrankheiten einer Kulturart für die Landwirtschaft bereitzustellen.

In der klassischen Pflanzenzüchtung halten biotechnologische Verfahren immer mehr Einzug. Gewebekulturen, Herbizidresistenzen, männliche Pollensterilität und Protoplastenfusionen zum Einbringen von Genen aus nicht-kreuzungsfähigen Pflanzen sind einige Beispiele für die Bedeutung moderner Technologien in der Pflanzenzüchtung (CALDIZ, 1994; DESTÉFANO-BELTRÁN et al., 1991). Durch die Transformation von Pflanzen besteht seit einigen Jahren die Möglichkeit, gezielt interessante Abwehrgene in ökonomisch bedeutende Sorten einzubauen. Dabei können die zur Verfügung stehenden Proteine zielgerichtet und auf den Pathogen abgestimmt ausgewählt werden. Eine Verbesserung der Basisresistenz und der horizontalen Resistenz ist auf diesem Weg möglich. Auch Einkreuzungen unerwünschter Merkmale, wie sie bei Kreuzungen von Kulturpflanzen mit Wildarten entstehen, werden hiermit verhindert. Langwierige Rückkreuzungen sind somit nicht mehr nötig, und die Entwicklungszeit für neue Sorten kann deutlich verkürzt werden.

Besonders geeignet für die Verbesserung der unspezifischen Resistenz mit Hilfe der Gentechnik sind zunächst einfache Abwehrreaktionen, die durch einzelne Proteine vermittelt werden. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet wurden daher auch mit den hydrolytischen Enzymen Glukanase und Chitinase, deren Wirkungsweise in der Abwehr von pilzlichen Pathogenen leicht nachvollziehbar ist, durchgeführt (KAUFFMANN et al., 1987; SALMERON & VERNOOIJ, 1998; SELA-BUURLAGE et al., 1993).

Auch die Klonierung sogenannter R-Gene in Kulturpflanzen ist seit einigen Jahren etabliert. Dabei können zwar identifizierte Resistenzgene (R-Gene) in Pflanzen transformiert werden, erfolgreich ist dieses Verfahren jedoch nur bei verwandten Pflanzenarten (BENT & YU, 1999).

Abwehrreaktionen, die auf komplexeren chemischen Reaktionen und damit auf mehreren Genen beruhen, sind bis heute schwer zu realisieren. Eine Reihe von Arbeiten konzentrieren sich daher vielmehr auf den Einbau mehrerer unterschiedlicher Abwehrproteine in Kulturpflanzen, um das Resistenzniveau dieser Pflanzen deutlich zu erhöhen und gleichzeitig das Risiko sich schnell entwickelnder neuer Pathogenrassen, die diese Resistenzen "überwinden", zu verringern (JACH et al., 1995; JONGEDIJK et al., 1995; ZHU et al., 1994).

### **5.1 Methodik der quantitativen Resistenzprüfung**

Forschungsarbeiten zur Verbesserung der Krankheitsresistenz von Kulturpflanzen bedingen immer auch eine Überprüfung des bearbeiteten Pflanzenmaterials hinsichtlich ihrer Widerstandskraft gegen wichtige Krankheitserreger. Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen, die Aussagen zum Resistenzverhalten im Feld geben könnten, sind in Deutschland wegen umfangreicher gesetzlicher Auflagen sehr aufwendig und lohnen sich erst, wenn gesicherte Hinweise auf verbesserte Resistenz aus Laborversuchen vorliegen.

Als Grundlage für Resistenzuntersuchungen an transgenen Pflanzen wurde in dieser Arbeit ein von Gieffers (GIEFFERS et al., 1989; GIEFFERS & FLADUNG 1999) entwickeltes Verfahren zur routinemäßigen Bestimmung der quantitativen Resistenz von Pflanzen verwendet und weiterentwickelt. Mit Hilfe einer speziell angefertigten Blattstanze wurden 2,0 oder 2,5 cm große Blattscheiben hergestellt und nach Inokulation mit einem Erreger in einer lichtdurchlässigen Kunststoffdose inkubiert. Die einfache aber effektive und gleichmäßige Wasserversorgung der auf Filterpapier liegenden Pflanzenteile konnte durch einen Polyacrylfaden, der in ein Wasserreservoir unterhalb des Filterpapiers reicht, gewährleistet werden. Im Vergleich zu anderen Verfahren, die Feuchteboxen verwenden, konnte durch die regulierte Wasserführung sowohl ein Überangebot an Wasser und damit ein frühzeitiges Faulen der Pflanzenteile sowie ein Wasserdefizit verhindert werden. Die Verwendung von Blattscheiben ermöglichte die Testung einer großen Pflanzenzahl bei gleichzeitig platzsparendem Versuchsaufbau im Labor. Zudem wurden die Bonituren, anders als bei der Verwendung ganzer Blättchen

(TROGNITZ, 1998), durch die einheitliche Größe der Blattscheiben sehr exakt und zusätzlich erheblich vereinfacht.

Für die Inokulation der Blattscheiben mit den verschiedenen Erregern erwiesen sich das Aufpipettieren einer definierten Menge Sporensuspension und das Aufsetzen von Myzel als geeignete Methoden. Insbesondere die Tropfeninokulation simuliert natürliche Infektionsbedingungen wie sie im Feld bei der Ansammlung von Pilzsporen in Tau- oder Regentropfen auf dem Blatt stattfinden. Die Inkubation der Versuche erfolgte in Kühlbrutschränken, die eine auf die Wirt-Pathogen-Interaktion abgestimmte Tag-Nacht-Simulation durch individuell regelbare Licht- und Temperatureinstellungen erzeugten. Unter diesen einheitlichen Bedingungen blieben z.B. Blattscheiben von Kartoffeln, je nach Alter des Materials und den gewählten Temperaturbedingungen, bis zu 14 Tage photosynthetisch aktiv, ohne Veränderungen an Blattfarbe und -struktur aufzuweisen. Erst danach setzte mit der Vergilbung des Gewebes ein langsamer Alterungsprozeß ein.

Ein bedeutender Vorteil der Bewässerungsboxen-Methode ist die Möglichkeit der Testung von gentechnisch veränderten Pflanzen aus dem Gewächshaus. Dabei werden die Testpflanzen nicht durch den Versuch zerstört, wie es bei der verbreiteten Sprühinokulation ganzer Pflanzen im Gewächshaus oder in Klimakammern der Fall ist (VLEESHOUWERS et al., 1999). Aus diesem Grund können Samen oder Knollen der Pflanzen, die in dieser Phase häufig nur in geringen Mengen vorhanden sind, geerntet werden. Ferner ist ein mehrmaliges Testen derselben Pflanzen oder das gleichzeitige Testen einer Linie mit zwei verschiedenen Pathogenen möglich. Darüber hinaus können dieselben Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien getestet werden, wodurch die Wirksamkeit der Resistenzproteine an unterschiedlich alten Pflanzen überprüft werden kann. Sogar eine Untersuchung von Sterilkulturpflanzen wie z.B. Tabak, der ausreichend große Blätter bildet, wird mit dieser Methode möglich.

Das Verfahren liefert zutreffende Aussagen zur Resistenz von Pflanzen, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert wurden. Gieffers (pers. Mitteilungen) konnte darüber hinaus nachweisen, daß für wichtige landwirtschaftliche Kulturen eine hohe korrelative Übereinstimmung der Befallsergebnisse von Blattscheibentests mit dem Feldbefall gegeben ist.

Eine besonders wichtige Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse bei vergleichenden Resistenztests ist die Verwendung einheitlichen Pflanzenmaterials. Hierfür müssen die Pflanzen unter optimalen Wachstumsbedingungen und frei von Pflanzenkrankheiten und -schädlingen im Gewächshaus angezogen werden. Für die Herstellung der Blattscheiben dürfen nur Blätter von gleicher Größe und aus gleichen Blattetagen entnommen werden. Wird uneinheitliches Blattmaterial verwendet, werden

Resistenzunterschiede zwischen den getesteten Linien verwischt bzw. vorgetäuscht. In solchen Fällen ist es schwierig, Befallsergebnisse in nachfolgenden Tests zu reproduzieren.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil dieser Prüfmethodik ist die besondere Genauigkeit der Bonitur. Mit Hilfe des iterativen Boniturverfahrens und des daraus abgeleiteten Boniturschemas (Abb. 9, Seite 44) wird der Befall der inkubierten Blattscheiben prozentual bewertet. Anders als bei anderen Boniturverfahren, die den Durchmesser der Befallsfläche an ganzen Blättchen messen (UMAERUS & LIHNELL, 1976), kann hier durch die einheitliche Größe der Blattscheiben eine exaktere Bewertung erfolgen. Eine hohe Anzahl von Einzelwerten, die durch die Verwendung einer Vielzahl von Blattscheiben erzielt wird, ermöglicht darüber hinaus eine einfache statistische Verrechnung der Ergebnisse.

Die Eignung dieses Testverfahrens zur Bewertung des Resistenzniveaus ließ sich anhand von Sortenversuchen bestätigen. So wurden die in Feldversuchen ermittelten und in der Bundessortenliste (BUNDESSORTENAMT, 1998) beschriebenen *Phytophthora*-Boniturnoten der Sorten Désirée, Secura und Panda mit dem Blattscheibentest reproduziert. Die Unterschiede der Boniturnoten von Désirée (5), Secura (6) und Panda (3) spiegeln sich in den Befallswerten dieses Versuchs (Désirée ca. 60 %, Secura ca. 80 % und Panda ca. 20 %) deutlich wider. Der Blattscheibentest mit Inkubation in Bewässerungsboxen ist somit gut geeignet bei vergleichenden Tests, Resistenzunterschiede zwischen verschiedenen Sorten bzw. Linien einer Pflanzenart zu ermitteln.

## **5.2 Transgene Pflanzen mit den Abwehrproteinen Glukanase, Chitinase und RIP**

Chitinasen und Glukanasen übernehmen im Abwehrmechanismus von Pflanzen eine eindeutige Rolle. Als hydrolytische Enzyme spalten sie Chitine bzw. Glukane. Beide Stoffe sind wichtige Bestandteile pilzlicher Zellwände. Die Wirkung dieser Enzyme gegenüber Pilzen *in vitro* wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (JI & KUC, 1996; MAUCH et al., 1988b; SCHLUMBAUM et al., 1986; SELA-BUURLAGE et al., 1993). Bereits Ende der achtziger Jahre begann auch die Transformation von Pflanzen mit diesen Proteinen. Ziel dieser Arbeiten war die Verbesserung der Abwehrfunktionen von Pflanzen gegen pilzliche Pathogene. Verwendet wurden dazu Chitinasen aus Pflanzen, Pilzen oder Bakterien (BROGLIE et al., 1991; JACH et al., 1995; NEUHAUS et al., 1991; SUSLOW et al., 1988; TERAOKAWA et al., 1997).

Broglie und Mitarbeiter (1991) beschrieben zudem synergistische Effekte bei gleichzeitiger Anwendung zweier Proteine *in vitro*. Auch die resistenzvermittelnde Wirkung dieser Proteine in verschiedenen Pflanzenarten wurde bereits häufig beschrieben (BORKOWSKA et al., 1998; JONGEDIJK et al., 1995; YOSHIKAWA et al., 1993; ZHU, et al., 1994). So konnten beispielsweise Jach und Mitarbeiter (1995) an Tabakpflanzen, die ein Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP) und Chitinase bzw. Glukanase und Chitinase koexprimierten, synergistisch verringerten Befall mit dem Bodenpathogen *Rhizoctonia solani* nachweisen.

Das Einbringen mehrerer Abwehrproteine in Kulturpflanzen ist aus verschiedenen Gründen besonders wichtig. Einerseits wäre bei einem Feldanbau von Pflanzen, die nur ein einziges Protein exprimieren, die Gefahr der Überwindung der Resistenz durch bestimmte Erreger vergleichbar hoch wie bei eingekreuzten Resistenzgenen aus anderen Kulturarten. Andererseits vermitteln die bisher untersuchten Proteine nur eine Teilresistenz, die in der Regel nur unter Gewächshausbedingungen getestet wurde. Ob diese Wirkung in gleichem Maße auch in der konventionellen Landwirtschaft zu erkennen sein wird, muß erst durch Feldversuche bestätigt werden. Mit der gleichzeitigen Expression mehrerer Proteine könnte das Resistenzniveau von Kulturpflanzen gegen bestimmte Pathogene möglicherweise stark erhöht werden (BENT & YU, 1999), wobei jedoch eine vollständige Resistenz wahrscheinlich nicht zu realisieren ist. Aus diesem Grund scheint die gleichzeitige Transformation mehrerer Abwehrproteine in Kulturpflanzen besonders sinnvoll. In dieser Arbeit wurden daher sowohl Kartoffel- und Tabakpflanzen, die nur ein Abwehrprotein exprimierten, als auch Pflanzen mit Doppelkonstrukten auf ihr Resistenzniveau gegenüber verschiedenen pilzlichen Erregern überprüft und anschließend miteinander verglichen.

### Tabak

In den hier durchgeführten Resistenzprüfungen wurden transgene Tabakpflanzen verwendet, die ein Ribosomen-inaktivierendes Protein aus Gerstensamen bzw. eine Chitinase aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* (LUND et al., 1989; ORDENTLICH et al., 1988) exprimierten. Eine weitere Tabaklinie koexprimierte das RIP- und das Chitinasegen.

Die erste Charakterisierung und Aufreinigung eines 30 kDa großen, Ribosomen-inaktivierenden Proteins vom Typ 1 aus Gerstenkörnern erfolgte von Leah und Mitarbeitern (1991). Die Wirkung des Proteins liegt in der Hemmung der Proteinsynthese durch spezifische Veränderung der 28S rRNA (ENDO et al., 1988; STIRPE & BARBIERI, 1986). Interessanterweise werden pflanzeigene Ribosomen durch das RIP nicht inaktiviert (ROBERTS & SELITRENNIKOFF, 1986; STIRPE & HUGHES,

1989). Diese besondere Eigenschaft, läßt eine Beteiligung solcher Proteine am Abwehrprozeß von Pflanzen vermuten. Durch das RIP könnte der Stoffwechsel von Pathogenen gehemmt und damit die Ausbreitung im Wirt möglicherweise verringert werden.

RIPs, wie z.B. das Ricin aus *Ricinus communis*, waren wegen ihrer Giftigkeit bereits im vergangenen Jahrhundert bekannt. Genauere Angaben zur Toxizität des Ribosomen-inaktivierenden Proteins aus Gerste liegen noch nicht vor (STIRPE et al., 1992). Aufgrund des Vorkommens in für Säugetiere ungiftigen Gerstensamen kann jedoch von einer relativ geringen Humantoxizität des RIPs ausgegangen werden.

Die Wirkung aufgereinigter Gersten RIPs *in vitro* wurden von Leah und Mitarbeitern (1991) untersucht. Am Beispiel von *Fusarium sporotrichoides* und *Trichoderma reesei* wurde die hemmende Wirkung des Proteins auf das Myzelwachstum von Pilzen überprüft. Dabei führten Konzentrationen zwischen 0,0037 und 0,01 µg / µl zu einer relativen Hemmung von nur 10 bis 20 %. Erst in Kombination mit einem hydrolytischen Enzym wie Glukanase oder Chitinase kam es zu einer synergistisch gesteigerten Hemmung des Pilzwachstums.

Die hier untersuchten transgenen Tabakpflanzen der Linie 28-6.11, die durch Transformation des Genotyps SR1 erhalten wurden, exprimierten das RIP-Gen gekoppelt mit dem  $\alpha$ -Amylase-Signalpeptid aus Gerste unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Der Proteinanteil des RIP am Gesamtprotein lag bei 2,1 % der interzellulären Waschflüssigkeit (IWF), wodurch eine Anreicherung in den Interzellularräumen von Tabakblättern bestätigt wurde (JACH et al., 1995). In einem Resistenztest mit dem bodenbürtigen Erreger *Rhizoctonia solani* zeigten die Autoren eine Reduktion des Jungpflanzenbefalls von ca. 50 % im Vergleich zur nicht-transgenen Tabaklinie SR1. Phänotypische Veränderungen, die von Görschen und Mitarbeitern (1997) für transgene Tabakpflanzen, die das Ribosomen-inaktivierende Protein JIP60 exprimierten, beschrieben werden, wurden an den hier untersuchten Pflanzenlinien nicht beobachtet.

In Blattscheibentests mit dem Erreger *B. cinerea* wiesen RIP- Pflanzen im Vergleich zu SR1 nur einen um ca. 20 % verringerten Befall auf. Die Wirkung des RIP gegen diesen Erreger *in planta* war somit nachweisbar und statistisch signifikant. Dennoch ist die durch das Protein vermittelte Resistenz allein wahrscheinlich nicht ausreichend, um im Feldanbau Ertragseinbußen durch Befall mit pilzlichen Erregern deutlich zu vermindern. Entsprechend den Untersuchungen zur *in vitro*-Wirkung des RIP von Leah und Mitarbeitern (1991) könnte jedoch eine Kombination mit einem weiteren Abwehrprotein zu einer starken Erhöhung der Befallsreduzierung führen.

In dieser Arbeit untersuchte Tabakpflanzen, die eine Exochitinase (CHI-A) aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, zeigten *in planta* eine höhere Resistenz gegen *B. cinerea* als RIP-Pflanzen. Der Anteil der nekrotisierten Blattscheibenfläche lag bei dieser Linie (34-3.1) im Mittel der Versuche um ca. 30 % niedriger als bei der nicht-transgenen Kontrolle. Die Wirkung der Chitinase auf das Wachstum von *B. cinerea* bei Befall von Tabakblättern war somit sehr deutlich zu erkennen. Wie aufgrund der *in vitro* Versuche von Benhamou und Mitarbeitern (1993) angenommen werden kann, ist die Aktivität der Chitinase wahrscheinlich auf den Abbau pilzlicher Zellwände im Bereich der Hyphenspitzen zurückzuführen. Durch diese Schädigung der Pilzstrukturen kommt es zu einer Verlangsamung des Wachstums, nicht jedoch zwangsläufig zur völligen Abtötung des Pilzes.

Tabakpflanzen, die sowohl das Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerste als auch die Chitinase aus *S. marcescens* exprimierten, zeigten nach Inokulation mit *B. cinerea* eine mittlere Befallsreduktion von 37 % im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle. Damit konnte das Resistenzniveau von Tabak durch die Koexpression der beiden Abwehrproteine nur geringfügig gesteigert werden. Von Jach und Mitarbeitern (1995) sowie Zhu und Mitarbeitern (1994) konnte bereits synergistisch gesteigerte Basisresistenz gegen verschiedene Erreger bei Koexpression von Glukanase und Chitinase gezeigt werden. Transgener Tabak wies deutlich verstärkte Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* (JACH et al., 1995) bzw. gegen *Cercospora nicotianae* (ZHU et al., 1994) auf.

Befallsprüfungen an den transgenen Tabakpflanzen mit dem bodenbürtigen Pathogen *Phytophthora nicotianae* führten zu Ergebnissen, die hohe Übereinstimmung zu den Versuchen mit *B. cinerea* aufwiesen. Die Expression des Gersten-RIP in Tabak vermittelte einen im Durchschnitt um 23,5 % verringerten Blattbefall. Die hemmende Wirkung des RIPs auf das Myzelwachstum von Pilzen im Blattgewebe war somit für die Pathogene *P. nicotianae* und *B. cinerea* vergleichbar.

Überraschenderweise zeigten Chitinase-exprimierende Tabakpflanzen eine Befallsreduktion von 55 % nach Inokulation mit *P. nicotianae*. Für *B. cinerea* konnte die Wirkung der Chitinase durch den Abbau von Zellwandbestandteilen im Bereich der Hyphenspitzen (BENHAMOU et al., 1993; COLLINGE et al., 1993; ORDENTLICH, 1988) erklärt werden.

Für den verlangsamten Befall der Blattscheiben mit *P. nicotianae* müssen andere Mechanismen verantwortlich sein. Da dieser Pilz als Oomycet kein Chitin als Baustein der Zellwände enthält, kann die enzymatische Funktion der Chitinase als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden. Zur Aufklärung der *in planta*-Wirkung von Chitinasen



gegen *P. nicotianae* müssen daher weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden. Möglicherweise führt die Anwesenheit von Chitinase in den Pflanzenzellen zu einer Induktion anderer PR-Proteine. Dies kann permanent der Fall sein, so daß bereits bei der Infektion des Pilzes eine erhöhte Abwehrbereitschaft der Pflanze besteht.

Wie bei den Resistenztests mit *B. cinerea* führte auch die Koexpression von RIP und Chitinase in Tabakpflanzen nur zu einer geringfügig gesteigerten Resistenz gegen *P. nicotianae*. Das Resistenzniveau der Linie 34-3.1x28-6.9 war zwar signifikant höher als das der Kontrolle, die quantitative Resistenz dieser Linien war jedoch im Vergleich zur Linie 34-3.1, die nur die Chitinase enthielt, nur leicht erhöht.

Für transgene Tabakpflanzen, die das Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerste oder die Exochitinase aus *Serratia marcescens* exprimierten, konnte somit gesteigerte Resistenz gegen die Pathogene *B. cinerea* und *P. nicotianae* nachgewiesen werden. Dabei lag das Resistenzniveau der Chitinase-Pflanzen höher als das der RIP-Pflanzen. Die Koexpression von RIP und CHI-A in Tabakpflanzen erbrachte nicht die gewünschten starken additiven oder synergistischen Effekte, die aufgrund der *in vitro*-Versuche von Leah und Mitarbeitern (1991) erwartet worden waren.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Jach und Mitarbeitern (1995), die 50 bis 60 % verringerten Befall von *Rhizoctonia solani* an diesen Doppelkonstruktlinien und damit deutlich verbesserte Resistenzwerte als bei Einzelkonstruktplanzen beschreiben, konnten in dieser Arbeit Unterschiede in vergleichbarer Höhe bei Verwendung von *B. cinerea* bzw. *P. nicotianae* als Testorganismen nicht festgestellt werden.

Während die Resistenz gegen den Bodenerreger *R. solani* in Jungpflanzentests untersucht wurden, erfolgten die Resistenzuntersuchungen mit den Pathogenen *B. cinerea* und *P. nicotianae* mit Hilfe von Blattscheibentests. Möglicherweise sind die abweichenden Versuchsergebnisse auf die unterschiedlichen Testsysteme zurückzuführen. Die Verwendung des Jungpflanzentests zur Ermittlung der Resistenz gegen *P. nicotianae* könnte in weiterführenden Untersuchungen zu einer höheren Übereinstimmung mit den Testergebnissen von *R. solani* (JACH et al., 1995) führen.

Die Wirkung von Chitinasen liegt eindeutig im Abbau pilzlicher Zellwände. Damit verbunden sind u.a. Wachstumsstörungen im Bereich der Hyphenspitzen und wahrscheinlich ein erleichterter Angriff anderer Stoffe, die am Abwehrprozeß beteiligt sind. Anders als Chitinasen müssen Ribosomen-inaktivierende Proteine zur Entfaltung ihrer toxischen Wirkung zunächst in die Hyphen gelangen. Die Aufnahme des Proteins in die Zellen des Pilzes erfolgt wahrscheinlich unspezifisch durch Endozytose. Da das RIP erfolgreich in den Pflanzen exprimiert wurde, wobei durch das Signalpeptid die

Sekretion in den Interzellularraum erfolgte, ist möglicherweise dieser ungerichtete Importmechanismus für die begrenzte Wirkung des Proteins verantwortlich.

Durch die Fusion des RIP mit einer Chitin-Bindedomäne (Lectin) aus der Brennessel (*Urtica dioica*) (RAIKHEL et al., 1993) sollte eine Anreicherung des Proteins im Zellwandbereich des Pilzes erreicht werden. Die Aufnahme des RIP in die Pilzzellen könnte durch diese Akkumulation gesteigert und die Wirkung des Proteins so erhöht werden.

Befallsversuche mit *B. cinerea* an Blattscheiben von drei transgenen Tabaklinien, die das Lectin-RIP-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors in unterschiedlich starken Konzentrationen exprimierten, wurden durchgeführt. Die Tabaklinie 202-2, für die im Western Blot keine Expression des Proteins nachweisbar war, zeigte wie erwartet im Befallstest keine deutlichen Unterschiede zur Kontrolle. Die Linie 202-3 mit starker Expression und die Linie 202-7 mit mittelstarker Expression des Lectin-RIPs zeigten im Vergleich zur Kontrolle 13 bzw. 18 % verringerten relativen Befall. Die resistenzvermittelnde Wirkung des Proteins war bei diesen Pflanzen somit nicht höher als bei der Tabaklinie 28-6.11, die keine Chitin-Bindedomäne enthielt und für die eine Befallsreduktion von 23,5 % ermittelt wurde. Durch die Fusion des RIP mit der Chitin-Bindedomäne konnte die Wirksamkeit des Ribosomen-inaktivierenden Proteins in Tabak gegen *B. cinerea* also nicht verbessert werden. Möglicherweise kommt es durch die Fusion des RIP-Gens mit der neuen Proteindomäne zu einer Aktivitätsverringerung des Proteins und damit zu einer geringeren Resistenzwirkung als bei Konstrukten, die das RIP ohne Lectin exprimierten. Ferner könnte die Bindedomäne eine stabile Anlagerung des Fusionsproteins an das Chitin pilzlicher Zellwände bewirken. Hierdurch kommt es dann möglicherweise zu einer Immobilisierung des RIP und damit zu einer verlangsamten Aufnahme in die Zellen des Pathogens.

Nicht nur für das RIP aus Gerste ist eine pilzhemmende Wirkung bekannt. Broekaert und Mitarbeiter (1989) konnten auch für das Lectin der Brennessel *in vitro* eine schwach inhibierende Wirkung auf chitinhaltige Pilze nachweisen. Bei dem hier verwendeten Fusionsprotein konnte jedoch keine gesteigerte Resistenzwirkung *in planta* nachgewiesen werden, die auf die Lectin-Bindedomäne zurückzuführen ist. Zur Aufklärung des Aktivitätsverlusts des Lectin-RIPs im Vergleich zum RIP sind weiterführende Expressionsstudien und *in vitro*-Versuche notwendig.

Bei einem Vergleich der Expressionsstärken der drei transgenen Linien ist auffällig, daß die mittel und die stark exprimierende Linie vergleichbar hohe Resistenzniveaus aufweisen. Anders als bei den Ergebnissen von Jach et al. (1995) ist hier jedoch keine deutliche Abhängigkeit zwischen der Stärke der Proteinexpression und der Wirksamkeit gegen pilzliche Pathogene *in planta* zu erkennen.

Gegen Befall mit *P. nicotianae* waren dieselben Pflanzen im Blattscheibentest deutlich resistenter als gegen Befall mit *B. cinerea*. Die Linien 202-3 und 202-7 waren zu 42 bzw. 28 % geringer befallen als die Kontrolle SR1. Wodurch die im Vergleich zur Linie 28-6.11 verbesserte Resistenz dieser transgenen Pflanzen begründet ist, ist zunächst nicht erkennbar. Da *P. nicotianae* als Oomycet kein Chitin in den Zellwänden enthält, kann die verbesserte Wirkung des RIP einerseits nicht auf die Chitin-Bindedomäne zurückgeführt werden. Andererseits kann damit eine stabile Bindung des Fusionsproteins an die Zellwand des Pathogens, wie sie für *B. cinerea* angenommen wurde, ausgeschlossen werden. Geht man darüber hinaus noch von einer direkten Wirkung der Chitinase aus, beruht die verbesserte Resistenzwirkung im Vergleich zur Linie 28 möglicherweise allein auf einer unterschiedlichen Proteinexpression. Auch eine direkte Wirkung der Lectin-Bindedomäne auf *P. nicotianae* kann nicht ausgeschlossen werden. Um die den Wirkmechanismus des Lectin-RIP abschließend aufzuklären sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

### Kartoffeln

In dieser Arbeit wurden insgesamt 22 transgene Kartoffellinien der Ausgangssorte Désirée aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. Jach (MPI für Züchtungsforschung, Köln) auf mögliche Resistenzen gegen *Phytophthora infestans* untersucht. Die Linien exprimierten das Ribosomen-inaktivierende Protein aus Gerste oder eines von drei Doppelkonstrukten (GLU/CHI-A, RIP/CHI-A, GLU/RIP) unter Kontrolle des 35S-Promotors. Dreizehn der untersuchten Linien zeigten in den Blattscheibentests keine oder nur geringe Befallsunterschiede zur nicht-transgenen Kontrolle. Weitere acht Linien wiesen mit Befallsreduktionen zwischen 40 und 50 % im Vergleich zu Désirée deutlich verbesserte Resistenz gegen *P. infestans* auf.

Kartoffelpflanzen, die RIP exprimierten, wiesen deutlich höhere Resistenz gegen pilzliche Erreger auf als RIP-Tabak. Anders als erwartet ging das Resistenzniveau der Doppelkonstrukt-Linien GLU/RIP und CHI-A/RIP jedoch nicht über das der Linie 2104/1, die nur das RIP exprimierte, hinaus. Durch die Koexpression eines der beiden hydrolytischen Enzyme Glukanase bzw. Chitinase mit dem Ribosomen-inaktivierenden Protein konnte hier somit keine verbesserte Resistenz von Kartoffelpflanzen gegen *P. infestans* im Vergleich zu Einzelkonstrukten mit RIP erzielt werden.

Insgesamt zeigen die Versuche jedoch Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jach und Mitarbeitern (1995), die die Resistenz von GLU/CHI-A und RIP/CHI-A transformierten Tabakpflanzen gegenüber *Rhizoctonia solani* untersuchten. Je drei Tabaklinien dieser Doppelkonstrukte zeigten Befallsreduktionen zwischen 25 und 60 %

in einem Jungpflanzentest und damit vergleichbare Werte wie die hier untersuchten transgenen Kartoffellinien in den *Phytophthora*-Befallstests.

Durch die konstitutive Expression der Abwehrproteine Glukanase, Chitinase und RIP konnten somit deutlich verbesserte Resistenzen in den Kulturpflanzen Tabak und Kartoffel erzeugt werden. Einige transgene Pflanzenlinien mit diesen neu integrierten Proteinen wiesen im Vergleich zu nicht-transgenen Pflanzen Befallsreduktionen zwischen 40 und 60 % auf. Dabei kann die gute Wirksamkeit der Proteine gegen phytopathogene Pilze *in planta* auf die direkte Wirkung als hydrolytische Enzyme bzw. als inhibierendes Protein (RIP) zurückgeführt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, daß die verwendeten resistenzvermittelnden Proteine für die Resistenzzüchtung sehr gut geeignet sind. Dabei sind zumindest das Ribosomen-inaktivierende Protein und die Glukanase wegen ihrer Herkunft aus Gerste wahrscheinlich nicht gesundheitsgefährdend und damit für die Verwendung in Nahrungsmittel- und Futterpflanzen geeignet.

Für die Kombination mehrerer Resistenzproteine wurde eine deutlich verbesserte quantitative Resistenz in Kulturpflanzen erwartet. Die hier untersuchten Pflanzenlinien, die zwei Fremdgene gleichzeitig exprimierten, wiesen jedoch keine Resistenzen auf, die signifikant über dem Maß von Einzelkonstruktpflanzen lagen.

In Tabelle 13 (Seite 96) sind die Ergebnisse aller Resistenztests zusammengestellt.

### **5.3 *In vitro*-Wirkung von Lysozymen gegen phytopathogene Pilze**

Bislang wurde angenommen, daß die antibakterielle Wirkung von Lysozymen auf der Funktion des Proteins als Muramidase beruht (SCHLEGEL & SCHMIDT, 1992). Durch den Abbau des Mureins, das Bestandteil der Bakterienzellwand ist, kommt es zur Auflösung der Bakterienzellwand. Für Lysozyme ist aber auch bekannt, daß sie bei niedrigen pH-Werten Chitinase-Funktion übernehmen können (DÜRING et al., 1999).

Die Untersuchungen von Düring und Mitarbeitern (1999) zeigen, daß T4-Lysozym und ein synthetisch hergestelltes Peptid aus dem C-Terminus des T4-Lysozyms eine deutliche antibakterielle Wirkung aufweisen. Zur Überprüfung einer möglichen hemmenden Wirkung des T4-Lysozyms auf pilzliche Pathogene wurden in dieser Arbeit *in vitro*-Tests zur Wirkung dieses Proteins auf keimende Pilzsporen durchgeführt. Dabei wurden zunächst die beiden Schaderreger *Phytophthora nicotianae* und *Fusarium oxysporum* für die Untersuchungen verwendet. Die folgenden Proteine bzw. Peptide wurden hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf Pilzhypen getestet: T4-Lysozym, T4-Lysozym-Mutante M6K, denaturiertes T4-Lysozym sowie die synthetisch

hergestellten Peptide A4 und A23. Die Mutante M6K zeichnet sich durch einen Austausch des hydrophoben Methionins durch das positiv geladene Lysin an Position 6 aus und wurde auch zur Transformation von Kartoffelpflanzen verwendet. Die Peptide A4 und A23 wurden aufgrund von Proteinsequenz-Computeranalysen des T4-Lys identifiziert (DÜRING et al., 1999). Dabei wurden mehrere Regionen in der Struktur des Proteins nachgewiesen, die typische Charakteristika amphipathischer Helices aufweisen. Das hier verwendete synthetische Peptid A23 entspricht dabei den Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  (Aminosäuren 126-141), während das Peptid A4 der Helix  $\alpha 4$  (Aminosäuren 143 bis 155) entspricht. Eine bakterizide Wirkung konnte nur für A4 von Düring und Mitarbeitern (1999) nachgewiesen werden. Da jedoch beide Peptide amphipathisch sind, wurden sie hier auf ihre Wirkung gegen phytopathogene Pilze untersucht.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß alle für die *in vitro*-Tests verwendeten Substanzen bei einer Konzentration von 0,5 µg/µl eine deutlich hemmende Wirkung sowohl auf keimende Konidien von *F. oxysporum* als auch auf keimende Zoosporen von *P. nicotianae* haben. Die Wirkung der T4-Lys-Mutante M6K und des durch Hitze denaturierten T4-Lys ist vergleichbar hoch wie die Wirkung des unbehandelten T4-Lysozyms. Auch die Peptide A4 und A23, die im T4-Lysozym amphipathische Helices bilden, bewirkten in den Keimschlauchlängentests eine Verringerung des Myzelwachstums von *P. nicotianae* und *F. oxysporum*.

Das Peptid A4 besitzt somit genau wie das T4-Lys sowohl eine antibakterielle (DÜRING et al., 1999) als auch eine fungistatische Wirkung. Für das Peptid A23 konnte lediglich eine hemmende Wirkung auf keimende Pilzsporen nachgewiesen werden. Da beide Peptide im T4-Lysozym amphipathische Helices bilden, kann der Unterschied in der Wirkungsbreite von A4 und A23 möglicherweise auf die unterschiedliche Membranzusammensetzung von Bakterien und Pilzen zurückgeführt werden.

Um eine Überprüfung der Wirkung der Lysozyme und Peptide auf den in den Pflanzentests verwendeten Erreger *P. infestans* zu ermöglichen, wurde ein Test, bei dem die Zoosporen des Pilzes in Wassertropfen keimen, entwickelt. Dabei wurden vier Konzentrationen zwischen 0,05 und 1,0 µg / µl von Hühnereiweißlysozym (HEWL), T4-Lysozym und Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. BSA wurde als Proteinkontrolle eingesetzt und hatte keinen erkennbaren Einfluß auf das Wachstum keimender Zoosporen. Die Zugabe von HEWL und T4-Lys hingegen führte zu einer starken Hemmung des Myzelwachstums. Dabei war eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung verlief jedoch nicht linear, sondern in Form einer Sättigungskurve, d.h. mit der zehnfachen Konzentration an Lysozym verringerte sich die mittlere Keimschlauchlänge nicht in gleichem Maße.

Ebenfalls zu erkennen war, daß die Wirkung des HEWL insbesondere bei höheren Konzentrationen stärker war als die Inhibition, die durch die gleiche Menge T4-Lys hervorgerufen wurde.

Anhand der Versuchsergebnisse konnte eine deutliche Wirkung von Lysozymen auf das Wachstum keimender Pilzsporen von *P. infestans*, *P. nicotianae* und *F. oxysporum* nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß auch das Keimhyphenwachstum von *Botrytis cinerea* und *Alternaria solani* durch Lysozyme gehemmt wird. Der Effekt von hitzedenaturiertem T4-Lys ist auch hier vergleichbar hoch wie die Wirkung des unbehandelten T4-Lysozyms.

Aus diesem Grund kann die Enzymfunktion der Lysozyme als Ursache für die hemmende Wirkung auf keimende Sporen ausgeschlossen werden. Auch eine evtl. Funktion der Proteine als Chitinasen scheidet als Ursache aus, da Chitinase-Aktivität nur bei sauren pH-Werten auftritt (DÜRING et al., 1999), bei diesen Untersuchungen jedoch mit Puffern im neutralen Bereich gearbeitet wurde. Insbesondere bei den Oomyceten *P. infestans* und *P. nicotianae*, die keine Chitine in den Zellwänden enthalten, kann diese Wirkung auch aus diesem Grund ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, daß denaturiertes und dadurch enzymatisch inaktives T4-Lysozym antimikrobielle Wirkung zeigt, wurde bereits von Düring und Mitarbeiter (1999) für Bakterien beschrieben. Auch Pellegrini und Mitarbeiter (1992) und Ibrahim und Mitarbeiter (1996a, 1996b, 1997) wiesen anhand verschiedener Untersuchungen nach, daß die Wirkung des HEWL nicht allein auf einer enzymatischen Funktion beruht. Pellegrini und Mitarbeiter (1997) beschrieben zudem eine durch HEWL hervorgerufene, elektronenmikroskopisch sichtbare Zerstörung bakterieller Membranen.

Die Keimschlauchlängentests mit verschiedenen Pilzen zeigten, daß die Peptide A4 und A23 fungistatische Wirkung auf keimende Pilzsporen besitzen. Der antimikrobiellen Wirkung des T4-Lys kann somit nicht nur eine enzymatische Wirkung zugrunde liegen. Die Aktivität des Proteins gegen Bakterien, aber insbesondere gegen Pilze kann vielmehr durch die amphipathischen Regionen des Moleküls erklärt werden. Für andere Peptide, deren Molekülstrukturen amphipathische Helices aufweisen, wurden antibakterielle Wirkungsweisen bereits nachgewiesen. Cecropin beispielsweise besitzt hemmende Wirkung auf verschiedene Pilze (u.a. *Phytophthora*) und Bakterien (ARCE et al., 1999; CAVALLERIN et al., 1998). Andere wichtige antimikrobielle Peptide sind Lactoferricin, das in Tabak Resistenz gegen *Ralstonia solanacearum* vermittelt (HWANG et al., 1998; ZHANG, 1998) sowie Sarcotoxin, das Resistenz gegen Bakterien in Tabak vermittelt (OHSHIMA et al., 1999) und möglicherweise bereits in einigen Jahren in der Medizin zur Behandlung von Krebs Anwendung finden wird (OKAMOTO et al., 1998).

Da bekannt ist, daß amphipathische Helices Zellmembranen schädigen, wurden Untersuchungen zum Wirkmechanismus der fungiziden Aktivität von T4-Lysozym, HEWL und A4 gegen phytopathogene Pilze durchgeführt. Nach dreistündiger Inkubation mit Lysozymen wurden Sporangien von *P. infestans* mit dem nicht membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff SYTOX angefärbt (REED et al., 1997). Während bei der Wasserkontrolle und bei Inkubation mit der Proteinkontrolle BSA nur eine geringe Färbung im Zellwandbereich zu erkennen war, fluoreszierten mit Ethanol abgetötete Sporangien leuchtend gelb (Abb. 22, Seite 64). Diese deutliche Fluoreszenz wiesen auch Sporangien auf, die mit T4-Lys, HEWL bzw. A4 inkubiert worden waren. Die Zugabe dieser Stoffe führte offenbar dazu, daß die Zellmembranen der Sporen beschädigt wurden und so der Farbstoff in das Zellinnere gelangen konnte. Mit diesem Test konnte somit die membranschädigende Wirkung von Lysozymen und des Peptids A4, die wahrscheinlich auf den Eigenschaften der amphipathischen Helices beruht, bewiesen und damit die antimikrobielle Wirkung gegen Pilze erklärt werden.

Bereits Trudel und Mitarbeiter (1995) wiesen die inhibierende Wirkung eines extrazellulären Extrakts von transgenen HEWL-exprimierenden Tabakpflanzen auf *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* nach. Den hemmenden Effekt auf den pilzlichen Erreger führen die Autoren dabei auf die Wirkung des HEWL als Chitinase zurück. Untersuchungen zur Resistenz des transgenen Tabaks gegen Pathogene wurden nicht beschrieben.

Auch Nakajima und Mitarbeiter (1997), die Humanlysozym in transgenen Tabakpflanzen exprimierten und eine verringerte Anfälligkeit dieser Pflanzen für Mehltau (*Erysiphe chicoracearum*) nachweisen konnten, gehen von einer chitinolytischen Wirkung des Proteins gegen diesen pilzlichen Pathogen aus. Hinweise auf die *in vitro*-Wirkung des Humanlysozyms auf den Erreger fehlen jedoch.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung von Lysozymen auf phytopathogene Pilze sowohl *in vitro* als auch *in planta* untersucht. Mit Hilfe von Keimschlauchlängentests wurde eine deutlich hemmende Wirkung von T4-Lys und HEWL auf das Myzelwachstum verschiedener Pilze ermittelt. Darüber hinaus zeigte auch eine T4-Lys-Mutante und hitzedenaturiertes T4-Lysozym wachstumshemmende Effekte. Da die fungistatische Wirkung der Lysozyme nicht auf Enzymfunktion zurückzuführen ist, müssen andere Wirkmechanismen von Bedeutung sein.

Die Proteinstruktur des T4-Lys weist einige Regionen mit amphipathischen Helices auf (DÜRING et al., 1999). Solche Proteinregionen können bekanntermaßen Wechselwirkungen mit Zellmembranen eingehen. Anhand von Färbetests mit Sporangien von

*P. infestans*, aber auch mit Bakterienzellen von *E. coli* (DÜRING et al., 1999) wurde gezeigt, daß T4-Lysozym tatsächlich Schädigungen an Zellmembranen von Pilzen und Bakterien verursacht, die zu einer deutlichen Verringerung des Pilzwachstums bzw. zum Abtöten von Bakterienzellen führten. Diese membranzerstörende Wirkung zeigten das T4-Lysozym und das Peptid A4 auch an Kartoffelprotoplasten, nicht jedoch im Hämolyse-Test mit Säugetierblut (DÜRING et al., 1999), was einen ersten positiven Hinweis zur biologischen Sicherheit gibt.

#### **5.4 Resistenzwirkung von Lysozymen in transgenen Kartoffelpflanzen**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kartoffelpflanzen stammten aus der Arbeitsgruppe von Dr. K. Düring und exprimierten das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors. Dieser Promotor bewirkt eine konstitutive Expression und somit eine permanente Bildung des Proteins in allen Pflanzengeweben (ODELL et al., 1985). Durch die Kombination des Gens mit dem  $\alpha$ -Amylase-Signalpeptid (SP) aus Gerste wird das Lysozym in die Interzellularräume der Pflanzen sekretiert (HIPPE et al., 1989) und ist im Falle eines Pathogenbefalls bereits am Infektionsort vorhanden. Die Expressionsstärke erfolgreich transformierter Kartoffellinien war mit ca. 0,0005 Prozent des löslichen Gesamtproteins verhältnismäßig gering (A. MAHN, persönliche Mitteilung).

Phytopathologische Untersuchungen des Pflanzenmaterials auf Resistenz gegen *Erwinia carotovora* hatten gezeigt, daß Knollen Lysozym-exprimierender Linien, die mit *Erwinia carotovora atroseptica* (E.c.a.) infiziert wurden, verbesserte Auflaufraten aufwiesen (DÜRING, 1994). Zudem führt die Expression des T4-Lysozyms zu verringerter Maturation des Knollengewebes nach Inokulation mit *E.c.a.* (DÜRING et al., 1993). Auch die Expression von HEWL in Kartoffelpflanzen führte zu erhöhter Resistenz gegen *E.c.a.* (SERRANO et al., 2000).

Aufgrund der starken inhibierenden Wirkung des T4-Lysozyms auf verschiedene phytopathogene Pilze *in vitro* wurden die vorhandenen transgenen T4-Lysozym-exprimierenden Kartoffellinien auch phytopathologisch auf Pilzresistenz untersucht. Dabei stellte sich insbesondere die Frage, ob Lysozyme geeignet sind, in Kulturpflanzen Resistenz gegen phytopathogene Pilze zu vermitteln.

Insgesamt sieben transgene T4-Lysozym-Kartoffellinien der Ausgangssorte Désirée (DL-Linien) wurden hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften gegenüber *P. infestans* in dieser Arbeit untersucht. Als Kontrollen für alle Versuche dienten Désirée-Pflanzen, die ebenfalls eine Sterilkulturphase durchlaufen hatten, und die transgene Kontrollinie



DK1, die nur das nptII-Gen enthält. Die Ergebnisse aller Resistenztests sind in Tabelle 13 (Seite 96) zusammengestellt.

Drei der untersuchten Lysozym-Kartoffellinien wiesen phänotypische Veränderungen auf. Die Linie DL15 konnte wegen des sehr geringen Wachstums und der nur etwa Daumennagel großen Blätter nicht mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zu den anderen Linien, insbesondere aber ein verzögertes Auflaufen der Knollen zeichnete die Linie DL4 aus. Die Linie DL11 wies ein gestauchtes Wachstum durch verkürzte Internodien und deformierte Blüten auf. Der Grund dieser phänotypischen Veränderungen ist wahrscheinlich auf somaklonale Variationen oder Positionseffekte zurückzuführen. Die Expression des Lysozyms allein ist sehr wahrscheinlich nicht für die Anomalien verantwortlich, da die anderen hier verwendeten transgenen Linien im Vergleich zu nicht-transgenen Pflanzen keine Unterschiede in Wachstum, Blüte und Abreife zeigten. Die im Gewächshaus erzielbaren Knollenerträge waren für alle Linien vergleichbar. Veränderungen oder Deformationen an den Knollen wurden nicht festgestellt.

Interessanterweise zeigten die beiden Linien mit phänotypischen Veränderungen (DL4 und DL11) nach Inokulation mit *P. infestans* im Vergleich zu den Kontrollen keine statistisch absicherbaren Befallsunterschiede. Blätter der Linie DL4 waren im Mittel der Versuche vergleichbar anfällig für *Phytophthora*-Befall wie die Kontrolle Désirée. Wahrscheinlich ist dies auf das verzögerte Auflaufen der Pflanzen und damit auf unterschiedlich entwickeltes Blattmaterial zurückzuführen.

Anders als bei der Linie DL4 entwickelten sich die Pflanzen der Linie DL11 zunächst in gleicher Weise wie die Kontrollen. Durch die Verkürzung der Internodien waren die Pflanzen jedoch etwas gestaucht. In den Befallstests wiesen Pflanzen dieser Linie eine durchschnittliche Befallsreduktion von ca. 40 % auf. Eine Überprüfung der Einzelergebnisse zeigt jedoch, daß bei drei der 13 Versuche der *Phytophthora*-Befall höher war als bei der Kontrolle. Damit waren die Daten mit dem Wilcoxon-Test statistisch nicht absicherbar.

Die Anwendung des Blattscheibentests zur Überprüfung der Anfälligkeit von Pflanzen für Krankheitserreger erlaubt es, Pflanzen mehrmals in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen. Daher wurden die zu testenden Kartoffellinien in klimatisierten Gewächshausabteilen angebaut und zwei- bis dreimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten geprüft. Ein Vergleich der Versuchsergebnisse zeigt, daß zwar geringe Unterschiede in der Befallsentwicklung zwischen Blättern von jüngeren und älteren Pflanzen erkennbar waren, eine Verschiebung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzenlinien im Laufe der Entwicklungsstadien jedoch nicht

auftrat. Die durch das Lysozym vermittelte quantitative Resistenz war demnach sowohl an Jungpflanzen als auch an blühenden Pflanzen gleichermaßen ausgeprägt.

Insgesamt wiesen fünf der sieben untersuchten transgenen Kartoffellinien (DL5, DL10, DL12, DL13 und DL14) im Vergleich zu den Kontrollen deutlich verbesserte Resistenzniveaus auf. Die Befallsmittelwerte dieser Linien lagen zwischen 35 und 60 % niedriger als bei Désirée und DK1 und waren somit signifikant verschieden. Da die Befallsmittelwerte von Désirée und der Kontrolle DK1, die nur das nptII-Gen enthält, vergleichbar waren, kann die verringerte Anfälligkeit der transgenen Lysozym-Linien auf die Expression des T4-Lysozyms zurückgeführt werden. Trotz der verhältnismäßig geringen Konzentration des Proteins in den Pflanzen führte das T4-Lysozym somit zu einer verbesserten Abwehrreaktion der ausgewählten Pflanzen bei Infektion mit *P. infestans*.

Die Daten zur Resistenz wurden aus Mittelwerten 13 unabhängiger Versuche berechnet. Jeder Mittelwert errechnet sich dabei aus den Befallswerten von 28 inokulierten Blattscheiben. Die Mehrzahl der inokulierten Blattscheiben aller Linien wurde von dem Pathogen infiziert. Nach zwei bis drei Tagen waren typische Befallssymptome sichtbar. Die Befallsstärke zum Zeitpunkt der Befallseinschätzung (5 und 6 dpi.) war bei den transgenen Linien jedoch deutlich geringer als bei den Kontrollpflanzen. Mit Hilfe der Bonitur in Prozent nekrotisierter Blattscheibenfläche konnten diese Unterschiede eindeutig ermittelt werden. Zu einem späteren Boniturzeitpunkt, z.B. nach 10 Tagen, waren alle Blattscheiben, die Anfangsbefall zeigten, zu 100 % befallen. Unter natürlichen Bedingungen im Feldanbau könnte diese Verzögerung jedoch ausreichend sein, um den Befall, der je nach Witterungsbedingungen unterschiedlich schnell voranschreitet, deutlich zu verlangsamen und damit in durchschnittlichen Befallsjahren den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu verringern.

Die Auswertung der Blattscheibentests zeigte weiterhin, daß trotz der gleichmäßigen Inokulation mit Sporangien von *P. infestans* die Anzahl der nicht befallenen Blattscheiben bei den transgenen Linien im Mittel etwas höher lag als bei den Kontrollen. Damit blieb bei Blattscheiben transgener Linien der Infektionsprozeß von *P. infestans* häufiger erfolglos als bei Blattscheiben von Désirée. Dieses Ergebnis wurde durch eine starke negative Korrelation ( $r = -0,95$ ) zwischen der Befallsstärke und der Zahl nicht befallener Blattscheiben bestätigt.

Neben *P. infestans* zählt *Alternaria solani* zu den wichtigsten Blattpathogenen im Kartoffelanbau. Daher wurden auch Versuche zur Ermittlung der *Alternaria*-Anfälligkeit transgener Lysozym-Kartoffeln durchgeführt. In der aus Zeitgründen auf vier Tests

begrenzten Versuchsreihe wiesen die Linien DL10, DL11, DL12, DL13 und DL14 nach Infektion mit *A. solani* um 40 bis 60 % verbesserte Resistenzniveaus auf. Obwohl die Ergebnisse der Untersuchungsreihe wegen der geringen Versuchszahl statistisch nicht absicherbar waren, zeigten die Boniturwerte, daß das T4-Lysozym Resistenz gegen *A. solani* vermittelt. Aufgrund eines abweichenden Wertes in einem der Versuche, lag der Befallsmittelwert der transgenen Kontrolle DK1 ebenfalls unterhalb der Sorte Désirée.

Ein Vergleich mit den Mittelwerten der *Phytophthora*-Befallstests ergab eine Korrelation von  $r=0,94$ . Die Ergebnisse beider Versuchsreihen zeigten somit große Übereinstimmung. Transgene Linien mit verbesserter quantitativer Resistenz gegen *P. infestans* wiesen ebenfalls geringere Anfälligkeit für Infektionen mit *A. solani* auf. Wie anhand der *in vitro*-Versuche erwartet werden konnte, ist die Wirksamkeit des T4-Lysozyms nicht allein auf Oomyceten beschränkt.

Die meisten Abwehrproteine von Pflanzen werden erst durch Pathogenbefall oder abiotische Streßfaktoren induziert. Dabei wird die Synthese dieser Proteine in der Regel durch Elicitoren induziert und die Produktion am Infektionsort eingeleitet. Die Verwendung induzierbarer Promotoren für die Expression von Resistenzproteinen ist vorteilhaft, da die Synthese des Proteins zeitlich begrenzt bleibt und somit die Gefahr der Resistenzbildung verringert wird.

In die phytopathologischen Untersuchungen wurden Kartoffelpflanzen einbezogen, die das T4-Lysozymgen unter Kontrolle des Mannopinsynthase-Promotors (mas-Promotor) exprimierten. Dieser Promotor stammt aus *Agrobacterium tumefaciens* und ist wund- und hormoninduzierbar (FELTKAMP et al., 1995; LANGRIDGE et al., 1989; SANGER et al., 1990). Durch die Wundinduktion kann die Expression des Lysozyms auf den Infektionsort fokussiert werden. Zusätzlich wurde die SP-Lysozym-Promotor-Sequenz zur Verringerung von Positionseffekten von zwei MAR-Regionen (matrix-associated-region) flankiert (BREYNE et al., 1992; PORSCHE et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden sechs transgene Linien mit diesem Konstrukt untersucht. Keine der Linien zeigte phänotypische Veränderungen. In den Befallstests mit *P. infestans* zeigten nur einige der transgenen Linien leichte Befallsreduktionen von bis zu 20 % im Vergleich zu Désirée. Die Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Kontrolle waren nicht signifikant.

Durch die Kombination des T4-Lysozyms mit dem mas-Promotor konnten somit keine befriedigenden Ergebnisse hinsichtlich der Resistenz transformierter Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* erzielt werden. Grund für diese geringe Wirkung des Konstrukts gegen den angreifenden Pathogen ist sehr wahrscheinlich

eine zu spät oder gar nicht eingeleitete Proteinsynthese, die den Erreger nach erfolgreicher Infektion nicht mehr wirkungsvoll abwehren kann. Ebenso ist die Proteinmenge, die nach der Induktion durch die Verwundung gebildet wird, möglicherweise nicht ausreichend, das Wachstum penetrierender Hyphen so stark zu hemmen, daß eine signifikante Befallsverminderung erkennbar wäre.

Neben transgenen Lysozym-Pflanzen der Sorte Désirée wurden auch Lysozym-Pflanzen der Sorten Secura und Panda auf ihre Resistenz gegenüber *P. infestans* untersucht. Hintergrund dieser Versuche war die Frage nach der Wirksamkeit des Lysozyms in Sorten mit geringer bzw. hoher Resistenz gegen *P. infestans*. Insbesondere interessierte die Frage, ob die Bildung des Proteins in Kartoffelsorten mit hoher bzw. geringer Anfälligkeit für den Erreger zu einer vergleichbaren Erhöhung des Resistenzniveaus führen könnte wie bei der Sorte Désirée.

Dazu wurden zunächst nicht-transformierte Pflanzen der Sorten Désirée, Secura und Panda in einem *Phytophthora*-Befallstest miteinander verglichen. Entsprechend den in der Beschreibenden Sortenliste (BUNDESSORTENAMT, 1998) angegebenen Anfälligkeitsnoten für *Phytophthora*-Krautfäule zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Sorten. Während die Sorte Secura deutlich anfälliger war als die Sorte Désirée, zeigte die Sorte Panda eine gute Resistenz gegen *P. infestans*. Das Ergebnis dieses Tests spiegelt die Angaben der Beschreibenden Sortenliste (BUNDESSORTENAMT, 1998) zur Anfälligkeit der Sorten in der Feldprüfung zutreffend wider.

Für die Untersuchungen zur resistenzvermittelnden Wirkung des Lysozyms in transgenen Secura-Linien wurden drei Linien eingesetzt, die das von MAR-Sequenzen flankierte SP-Lys unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten. Eine transgene Kontrolle, die nur das nptII-Gen exprimierte, stand leider nicht zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Blattscheibentests zeigten deutlich, daß die relativen Befallsmittelwerte in gleicher Weise wie bei den DL-Linien reduziert waren. Im Mittel der fünf durchgeführten Tests wiesen die drei transgenen Linien Befallsreduktionen von ca. 40 bis 60 % im Vergleich zu Secura auf. Damit zeigte sich, daß sowohl in transgenen Linien der mittelstark für *Phytophthora* anfälligen Sorte Désirée als auch in Linien der stark anfälligen Sorte Secura durch die konstitutive Expression des T4-Lysozyms deutlich verbesserte quantitative Resistenzen gegen den Erreger erzielt werden konnten. Die relative Erhöhung der Resistenzniveaus von transgenen Linien der Sorten Désirée und Secura waren somit vergleichbar.

Auch transgene Linien der Sorte Panda, die das T4-Lysozymgen unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, wurden auf ihre Resistenz gegenüber *P. infestans*

untersucht. Aus Zeitgründen konnten nur vier Befallstests mit drei transgenen Linien durchgeführt werden. Eine transgene Kontrolllinie, die nur das nptII-Gen, nicht aber das T4-Lysozymgen enthält, stand für Panda leider ebenfalls nicht zur Verfügung.

Die Boniturwerte der Blattscheibentests lagen wegen der hohen Resistenz der Sorte auch am siebten Tag nach der Inokulation deutlich niedriger als bei den Versuchen mit transgenen Linien der Sorte Désirée. Trotzdem war eine verbesserte Resistenz dieser Linien gegen *P. infestans* zu beobachten. Die untersuchten Linien wiesen im Durchschnitt einen um 35 bis 40 % verringerten Befall im Vergleich zu Panda auf. Aufgrund des ohnehin verhältnismäßig hohen Resistenzniveaus von Panda (BUNDESSORTENAMT, 1998) dürften transgene Linien dieser Kartoffelsorte im Feldanbau besonders widerstandsfähig gegen Befall mit phytopathogenen Pilzen sein. Durch die Transformation und phytopathologische Untersuchung verschiedener Kartoffelsorten konnte gezeigt werden, daß T4-Lysozym unabhängig von der natürlichen Basisresistenz einer Sorte verbesserten Schutz gegen pilzliche Pathogene vermittelt. Mit Hilfe der Gentechnik kann folglich nicht nur die quantitative Resistenz von Sorten mit hoher Krankheitsanfälligkeit, sondern auch die Resistenz gering anfälliger Sorten weiter verbessert werden.

Die Expression von T4-Lysozym in Kartoffelpflanzen führt zu einem verringerten Wachstum von phytopathogenen Pilzen nach Infektion von Blattscheiben. Die dabei gemessenen Befallsreduktionen von bis zu 60 % machen Lysozyme zu einer interessanten Proteingruppe für die molekulare Resistenzzüchtung, insbesondere im Hinblick auf die Doppelwirkung dieser Proteine gegen Bakterien und Pilze (Düring et al., 1999). Zudem sind Lysozyme wahrscheinlich als Resistenzproteine für Nahrungsmittelpflanzen geeignet, da sehr viele tierische und pflanzliche Nahrungsmittel natürlicherweise Lysozyme enthalten. So enthält z.B. Hühnereiweiß ca. 3,2 mg/ml (CONNER, 1993) und Blumenkohl ca. 27,6 µg/ml (PROCTOR et al., 1988) Lysozym. Wie hier gezeigt werden konnte, ließ auch Hühnereiweißlysozym in unbehandelter wie in denaturierter Form antimikrobielle Wirkung erkennen. Da das T4-Lysozym den gleichen Wirkmechanismus aufweist, ist auch die Aufnahme von T4-Lysozym über Nahrungsmittel wahrscheinlich unbedenklich.

Die Untersuchung von Lysozym exprimierenden Kartoffellinien ergab, daß Wurzeln dieser Pflanzen Lysozym sekretieren und das ausgeschiedene Protein antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien aufweist (DE VRIES et al., 1999). Zudem konnte nachgewiesen werden, daß die Überlebensrate von *Bacillus subtilis* Bakterien an Haarwurzeln von Lysozym-Pflanzen deutlich geringer war als an Kontrollpflanzen (AHRENHOLTZ et al., 2000). Andererseits haben umfangreiche Unter-

suchungen, die im Rahmen der biologischen Begleitforschung von Freisetzungsvorversuchen mit Lysozym-Kartoffeln durchgeführt wurden, keine nachhaltige Veränderung der in der Phyllosphäre angesiedelten Bakteriengemeinschaften ergeben (HEUER & SMALLA, 1999; LOTTMAN et al., 1999). Grund dafür ist möglicherweise die auf einen sehr engen Raum um die Haarwurzeln begrenzte Wirkung des Lysozyms, die auf einen schnellen Abbau durch von Bodenmikroorganismen ausgeschiedenen Proteasen bzw. eine Bindung an Bodenpartikel begründet ist und damit die Anreicherung von Lysozym im Boden verhindert.

**Tab. 13: Zusammenfassung der Resistenzuntersuchungen mit transgenen Tabak- und Kartoffellinien. Die Versuchsmittelwerte sind als relativer Befall in % im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen SR1 bzw. Désirée, Secura und Panda (100 %) angegeben (p35S = CaMV 35S-Promotor, pmas = Mannopinsynthese-Promotor, RIP = Ribosomen-inaktivierendes Protein, CHI-A = Chitinase-A, GLU = Glukanase, T4-Lys = T4-Lysozym).**

| <b>Tabak</b>                       | <b><i>B. cinerea</i></b>   | <b><i>P. nicotianae</i></b> |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>SR1</b>                         | 100,0                      | 100,0                       |
| 28-6.11 (p35S-RIP)                 | 77,1                       | 76,5                        |
| 34-3.1 (p35S-CHI-A)                | 68,4                       | 45,0                        |
| 34-3.1 x 28-6.9 (p35S-CHI-A x RIP) | 62,6                       | 42,4                        |
| 202-2 (p35S-Lectin RIP (-))        | 94,4                       | 69,1                        |
| 202-3 (p35S-Lectin RIP (++)        | 87,0                       | 57,6                        |
| 202-7 (p35S-Lectin RIP (+))        | 82,1                       | 71,4                        |
| <b>Kartoffel</b>                   | <b><i>P. infestans</i></b> | <b><i>A. solani</i></b>     |
| <b>Désirée</b>                     | 100,0                      | 100,0                       |
| 2104/1 (p35S-RIP)                  | 53,4                       |                             |
| 3102/4 (p35S-GLU/CHI-A)            | 52,6                       |                             |
| 3402/2 (p35S-GLU/CHI-A)            | 47,5                       |                             |
| 3402/3 (p35S-GLU/CHI-A)            | 58,3                       |                             |
| 3602/3 (p35S-GLU/CHI-A)            | 57,7                       |                             |
| 4301/2 (p35S-RIP/CHI-A)            | 54,2                       |                             |
| 4301/4 (p35S-RIP/CHI-A)            | 56,0                       |                             |
| 5102/3 (p35S-GLU/RIP)              | 69,0                       |                             |
| 5114/1 (p35S-GLU/RIP)              | 52,3                       |                             |
| DL4 (p35S-T4-Lys)                  | 104,4                      | 119,8                       |
| DL5 (p35S-T4-Lys)                  | 65,8                       | 92,3                        |
| DL10 (p35S-T4-Lys)                 | 40,8                       | 56,5                        |
| DL11 (p35S-T4-Lys)                 | 57,3                       | 61,3                        |
| DL12 (p35S-T4-Lys)                 | 40,4                       | 37,8                        |
| DL13 (p35S-T4-Lys)                 | 51,6                       | 53,0                        |
| DL14 (p35S-T4-Lys)                 | 57,9                       | 63,3                        |
| 8-41-1 (pmas-T4-Lys)               | 79,5                       |                             |
| 8-41-2 (pmas-T4-Lys)               | 87,9                       |                             |
| 8-41-3 (pmas-T4-Lys)               | 90,5                       |                             |
| 8-41-4 (pmas-T4-Lys)               | 96,9                       |                             |
| 8-41-5 (pmas-T4-Lys)               | 80,4                       |                             |
| 8-41-11 (pmas-T4-Lys)              | 101,2                      |                             |
| <b>Secura</b>                      | 100,0                      |                             |
| 201/5 (p35S-T4-Lys, Secura)        | 63,1                       |                             |
| 202/11 (p35S-T4-Lys, Secura)       | 58,2                       |                             |
| 208/5 (p35S-T4-Lys, Secura)        | 42,7                       |                             |
| <b>Panda</b>                       | 100,0                      |                             |
| DL1 (p35-S-T4-Lys, Panda)          | 59,6                       |                             |
| DL2 (p35-S-T4-Lys, Panda)          | 62,4                       |                             |
| DL3 (p35-S-T4-Lys, Panda)          | 65,1                       |                             |

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Lysozyme auf mehrere phytopathogene Pilze *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wurde die Resistenzwirkung der Abwehrproteine Glukanase, Chitinase, T4-Lysozym und eines Ribosomen-inaktivierenden Proteins (RIP) in transgenen Tabak- bzw. Kartoffelpflanzen gegen pilzliche Pathogene überprüft. Hierzu wurden Befallstests mit Blattscheiben von Gewächshauspflanzen, die in einer Bewässerungsbox inkubiert wurden, verwendet.

1. Transgene Tabakpflanzen, die ein Ribosomen-inaktivierendes Protein aus Gerstenkörnern exprimierten, zeigten nach Inokulation mit *Botrytis cinerea* einen um 22 % reduzierten Befall. Die Expression einer Exochitinase aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* führte im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle zu einer Verringerung des Blattscheibenbefalls mit *B. cinerea* um durchschnittlich 31 %. Wurden das RIP und die Chitinase in Tabak koexprimiert, so wiesen Pflanzen dieser Linie durchschnittlich 37 % weniger Befall auf. Damit konnte das Resistenzniveau von Tabak durch die Expression beider Proteine im Vergleich zu den Einzelkonstrukten nur leicht gesteigert werden.
2. Nach Inokulation von Blattscheiben mit *Phytophthora nicotianae* zeigten RIP exprimierende Tabakpflanzen 33 % und Chitinase exprimierende Pflanzen 55 % weniger Befall als Kontrollpflanzen. Die Koexpression der Proteine führte bei Befall mit *P. nicotianae* zu einer Befallsreduktion von 57 % und damit nicht zu einer deutlich verbesserten Resistenz.
3. Neben Tabak wurden auch transgene Kartoffellinien, die verschiedene Kombinationen von Abwehrproteinen exprimierten, getestet. Diese Pflanzen mit den Doppelkonstrukten Glukanase/Chitinase, Glukanase/RIP bzw. RIP/Chitinase wurden im Blattscheibentest auf ihre Anfälligkeit für *Phytophthora infestans* untersucht. Acht der insgesamt 22 getesteten Linien wiesen Befallsreduktionen von 40 bis 50 % im Vergleich zur Ausgangssorte Désirée auf.
4. Die Wirkung von T4-Lysozym, der T4-Lysozym-Mutante M6K, Hühnereiweiß-lysozym sowie der T4-Lysozym-Peptide A4 und A23 auf Sporen verschiedener pilzlicher Pathogene wurde anhand von Keimschlauchlängentests ermittelt. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß diese Proteine und Peptide einen stark hemmenden Effekt auf das Wachstum keimender Konidien von *Fusarium oxysporum* sowie Zoosporen von *P. nicotianae* und *P. infestans* besitzen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch durch Hitze denaturiertes Lysozym, daß



keine Enzymfunktion mehr besitzt, diese wachstumshemmende Wirkung aufweist. Damit konnte die Enzymfunktion des Lysozyms (Muramidase) als Ursache für die pilzhemmende Wirkung ausgeschlossen werden.

5. Anhand eines Färbetests mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOX wurde erstmals mikroskopisch gezeigt, daß Lysozyme und davon abgeleitete Peptide die Membranstruktur von *P. infestans*-Sporangien beeinflussen. Die inhibierende Wirkung von Lysozymen kann daher auf diese membranschädigende Wirkung zurückgeführt werden. Verantwortlich für diese Funktion sind wahrscheinlich amphipathische Helices in der Struktur des T4-Lysozyms. Die isolierten Peptide A4 und A23 entsprechen Regionen des Moleküls mit dieser charakteristischen Struktur.
6. In Blattscheibentests wiesen Kartoffelpflanzen, die das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, signifikant verringerten Befall mit *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* auf. Die Befallswerte von fünf getesteten Linien lagen dabei um 40 bis 60 % niedriger als bei den Kontrollpflanzen.
7. Bei den Kartoffelsorten Secura und Panda, die eine sehr hohe bzw. sehr geringe natürliche Anfälligkeit für *Phytophthora*-Befall aufweisen, führte die Expression des T4-Lysozyms ebenfalls zu einer Erhöhung des Resistenzniveaus. Drei transgene Linien dieser Sorte Secura wiesen nach Infektion mit *P. infestans* Befallsreduktionen zwischen 37 und 57 % auf. Der Befall an transgenen Linien der Sorte Panda lag bis zu 40 % niedriger als bei den Kontrollpflanzen.
8. Unter Kontrolle des wund- und hormoninduzierbaren Mannopinsynthese-Promotors vermittelte das T4-Lysozymgen in transgenen Kartoffeln jedoch keine signifikant erhöhte Resistenz gegen *P. infestans*. Pflanzen mit diesem Konstrukt wiesen nur bis zu 20 % verringerten Befall auf.

Die hier untersuchten Abwehrproteine (Glukanase, Chitinase, RIP und T4-Lysozym) vermitteln in Kulturpflanzen erhöhte quantitative Resistenz gegen verschiedene phytopathogene Pilze. Sie stellen damit besonders geeignete Resistenzfaktoren für die molekulare Pflanzenzüchtung dar. Insbesondere T4-Lysozym, das *in planta* eine resistenzvermittelnde Wirkung sowohl gegen Pilze als auch gegen Bakterien zeigt und dessen nicht-enzymatischer Wirkmechanismus mit dieser Arbeit weiter aufgeklärt wurde, bietet für die Zukunft vielfältige Möglichkeiten für die Resistenzzüchtung von Kartoffel, Tabak und anderen Kulturpflanzen.

## 7 Literaturverzeichnis

- AGRIOS, G.N. 1988. Plant Pathology. 3. Edition, Academic Press, San Diego
- AHRENHOLTZ, I., HARMS, K., DE VRIES, J., WACKERNAGEL, W. 2000. Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. Applied and Environmental Microbiology, 66 (5): 1862-1865.
- ALEXANDER, D., GOODMAN, R.M., GUTRELLA, M., GLASCOCK, C., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., MADDOX, D., AHL-GOY, P., LUNTZ, T., WARD, E., RYALS, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proceedings of the National Academy of Science USA, 90: 7327-7331.
- ARCE, P., MORENO, M., GUTIERREZ, M., GEBAUER, M., DELL'ORTO, P., TORRES, H., ACUNA, I., OLIGER P., VENEGAS, A., JORDANA, X., KALAZICH, J., HOLUIGUE, L. 1999. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. American Journal of Potato Research, 76 (3): 169-177.
- AUDY, P., TRUDEL, J., ASSELIN, A. 1988. Purification and characterization of a lysozyme from wheat germ. Plant Science, 58: 43-50.
- BARTNICKI-GARCIA, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology, 22: 87-108.
- BEFFA, R. & MEINS, F. 1996. Pathogenesis-related functions of plant  $\beta$ -1-3-glucanase investigated by antisense transformation - a review. Gene, 179: 97-103.
- BENHAMOU, N., BROGLIE, K., BROGLIE, R., CHET, I. 1993. Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspects of chitin breakdown. Canadian Journal of Microbiology, 39: 318-328.
- BENT, A.F. & YU, I.C. 1999. Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. Advances in Agronomy, 66: 251-298.
- BOLLER, T., GEHRI, A., MAUCH, F., VÖGELI, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylen, purification, properties, and possible function. Planta 157: 22-31.
- BOLLER, T. 1989. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives Vol. 2. Eds.: T. Kosuge, E.W. Nester. McGraw-Hill Publishing Company. Pages 385-413.
- BORKOWSKA, M., KRZYMOWSKA, M., TALARCZYK, A., AWAN, M.F.M., YAKOOVLEVA, L., KLECZKOWSKI, K., WIELGAT, B. 1998. Transgenic potato plants expressing soybean  $\beta$ -1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. Zeitschrift für Naturforschung, 53c: 1012-1016.
- BRANDENBURGER, W. 1984. Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- BREDERODE F.T., LINTHORST, H.J.M., Bol, J.F. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Molecular Biology, 17: 1117-1125.
- BREYNE, P., VAN MONTAGU, M., DEPICKER, A., GHEYSEN, G., 1992. Characterisation of plants scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. Plant Cell 4: 463-471.

- BROEKAERT, W.F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., JOOS, H., PEUMANS, W.J. 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 245: 1100-1102.
- BROGLIE, K., CHET, I., HOLLIDAY, M., CRESSMAN, R., BIDDLE, P., KNOWLTON, S., MAUVAIS, C.J., BROGLIE, R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254: 1194-1197.
- BUNDESSORTENAMT. Beschreibende Sortenliste Kartoffeln 1998. Hrsg. Bundessortenamt. Landbuch-Verlag Hannover.
- CALDIZ, D.O. 1994. Genetic improvement and associated physiological changes in the potato. Genetic improvement of field crops. M. Dekker, New York, Pages 361-411.
- CARLILE, M.J. 1983. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 95-107.
- CARUSO, C., CHILOSI, G., CAPORALE, C., LEONARDI, L., BERTINI, L., MAGRO, P., BUONOCORE, V. 1999. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 140: 87-97.
- CAVALLARIN, L., ANDREU, D., SEGUNDO, B.S. 1998. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 11 (3): 218-227.
- CHRIST, U. & MÖSINGER, E. 1989. Pathogenesis-related proteins of tomato: I. Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlation with resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35: 53-65.
- COFFEY, M.D. & WILSON, W.E. 1983. Histology and cytology of infection and disease caused by *Phytophthora infestans*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 289-301.
- COLEY-SMITH, J.R. 1980. Sclerotia and other structures in survival. In: *The Biology of Botrytis*. Eds.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., and Jarvis, W.R., Academic Press, London. Pages 85-114.
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3 (1): 31-40.
- CONNER, D.E. 1993. Naturally occurring compounds. In: *Antimicrobials in Food*. Eds.: P.M. Davidson and A.L. Branen. Marcel Dekker, Inc., New York. Pages 441-468.
- DANN, E.K., MEUWLY, P., MÉTRAUX, J.P., DEVERALL, B.J. 1996. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1-3-glucanase and accumulations of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 307-319.
- DATLA, R.S.S., HAMMERLINDL, J.K., PANCHUCK, B., PELCHER, L.E., KELLER, W. 1992. Modified binary plant transformation vectors with the wild-type gene encoding NPTII. *Gene*, 211: 383-384.
- DE VRIES, J., HARMS, K., BROER, I., KRIETE, G., MAHN, A., DÜRING, K., WACKERNAGEL, W. 1999. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 280-286.
- DESTÉFANO-BELTRÁN, L., NAGPLATA, P., JAEHO, K., DODDS, J.H., JAYNES, J.M. 1991. Genetic transformation of potato to enhance nutritional value and confer disease resistance. In: *Plant Gene Research. Molecular Approaches to Crop Improvement*. Eds.: E.S. Dennis, D.J. Llewellyn. Springer-Verlag, New York. Pages 17-32.

- DOMSCH, K.H. & GAMS, W. 1993. Compendium of soil fungi. IHW Verlag, Braunschweig, Baarn. Pages 150-155.
- DÜRING, K. 1993. Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? *Plant Molecular Biology*, 23: 209-214.
- DÜRING, K., PORSCH, P., FLADUNG, M., LÖRZ, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal*, 3 (4): 587-598.
- DÜRING, K. 1994. Strategies towards introducing resistance to bacterial pathogens in transgenic potatoes. *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, 2<sup>nd</sup> Edition. Eds. Belknap, W.R., Vayda, M.E., Park, W.D., CAB International, Wellingford. 221-232.
- DÜRING, K., PORSCH, P., MAHN, A., BRINKMANN, O., GIEFFERS, W. 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters*, 449: 93-100.
- ELLIS, M.B. 1971. *Dematiaceae Hyphomycetes. The Genera*. CAB International. Pages 28-582.
- ENDO, Y., TSURUGI, K., EBERT, R.F. 1988. The mechanism of action of barley toxin: a type 1 ribosome-inactivating protein with RNA N-glycosidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 954: 224-226.
- ERWIN, D.C. 1983. Variability within and among species of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 149-165.
- FELIX, G. & MEINS, F. Jr. 1986. Developmental and hormonal regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Planta*, 167: 206-211.
- FELTKAMP, D., BAUMANN, E., SCHMALENBACH, W., MASTERSON, R., ROSAHL, S. 1995. Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the *mas* elements and correlates with high transcript levels of *mas*-binding factor. *Plant Science*, 109: 57-65.
- FLADUNG, M. & GIEFFERS, W. 1993. Resistance reactions of leaves and tubers of *ro/C*-transgenic tetraploid potato to bacterial and fungal pathogens. Correlations with sugar, starch and chlorophyll content. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42: 123-132.
- FRASER, R.S.S. 1981. Evidence for the occurrence of the 'pathogenesis-related' proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiological Plant Pathology*, 19: 69-76.
- GALLEGLY, M.E. 1983. Summary of the open discussion session on taxonomy of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 173-174.
- GARCIA-GARCIA, F., SCHMELZER, E., HAHLBROCK, K., ROXBY, R. 1994. Differential expression of chitinase and  $\beta$ -1-3-glucanase genes in various tissues of potato plants. *Zeitschrift für Naturforschung*, 49c: 195-203.
- GIEFFERS, W. & FLADUNG, M. 1999. Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme Perspektiven. Hrsg. Umweltbundesamt.
- GIEFFERS W., PAUL, V.H., RITTER, E. 1989. Der Einfluß von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienkonzentration von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton, Merkmale zur Morphologie und dessen Nachweis an Dikotyledonen. *Journal of Phytopathology*, 126: 115-132.

- GÖRSCHEN, E., DUNAEVA, M., HAUSE, B., REEH, I., WASTERACK, C., PARTHIER, B. 1997. Expression of the ribosome-inactivating protein JIP60 from barley in transgenic tobacco leads to abnormal phenotype and alternation on the level of translation. *Planta*, 202: 470-478.
- GOODING, G.V. & LUCAS, G.B. 1959. Effect of inoculum level on the severity of tobacco black shank. *Phytopathology* 49: 274-278.
- HEUER, H. & SMALLA, K. 1999. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Ecology*, 28 (4): 357-371.
- HIPPE, S., DÜRING, K., KREUZALER, F. 1989. *In situ* localization of a foreign protein in transgenic plants by immunoelectron microscopy following high pressure freezing. Freeze substitution and low temperature embedding. *European Journal of Cell Biology*, 50: 230-234.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R., HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
- HOFFMANN, G.M. 1999. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. III Kartoffel. Ulmer, Stuttgart. Seiten 280-371.
- HOFFMANN, G.M., NIENHAUS, F., POEHLING, H.-M., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H.C., WILBERT, H. 1994. Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- HOOKE, W.J. 1983. Compendium of potato diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul. Pages 40-42.
- HWANG, P.M., ZHOU, N., SHAN, X., ARROWSMITH, C.H., VOGEL, H.J. 1998. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry*, 37 (12): 4288-4298.
- IBRAHIM, H.R., HIGASHIGUCHI, S., JUNEJA, L.R., KIM, M., YAMAMOTO, T. 1996a. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1416-1423.
- IBRAHIM, H.R., HIGASHIGUCHI, S., KOKETSU, M., JUNEJA, L.R., KIM, M. 1996b. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3799-3806.
- IBRAHIM, H.R., HIGASHIGUCHI, S., SUGIMOTO, Y., AOKI, T. 1997. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 89-94.
- JACH, G., GÖRNHARDT, B., MUNDY, J., LOGEMANN, J., PINSORF, E., LEAH, R., SCHELL, J., MAAS, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8 (1): 97-109.
- JARVIS, W.R. 1980. Epidemiology. In: The Biology of Botrytis. Eds.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., and Jarvis, W.R., Academic Press, London. Pages 219-250.
- JENSEN, A.B., LEAH, R., CHAUDRY, B., MUNDY, J. 1999. Ribosome-inactivating proteins: structure, function, and engineering. In: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Eds.: Datla, S.K., Muthukrishnan, S., CRC Press, New York. Pages 235-245.
- Ji, C. & KUC, J. 1996. Antifungal activity of cucumber  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 257-265.

- JONGEDIJK, E., TIGELAAR, H., VAN ROEKEL, F.S.C., BRES-VLOEMANS, S.A., DEKKER, I., VAN DEN ELZEN, P.J.M., CORNELISSEN, B.J.C., MELCHERS, L.S. 1995. Synergistic activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85: 173-180.
- KAUFFMANN, S., LEGRAND, M., GEOFFROY, P., FRITIG, B. 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *The EMBO Journal*, 6 (11): 3209-3212.
- KEEFE, D., HINZ, U., MEINS, F. JR. 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*, 182: 4351.
- KLINKOWSKI, M., MÜHLE, E., REINMUTH, E., BOCHOW, H. 1974. *Phytopathologie und Pflanzenschutz. Band II. Krankheiten und Schädlinge landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*, 2. Aufl., Akademie-Verlag Berlin. Seiten 668-669.
- KOMBRINK, E., SCHRÖDER, M., HAHLBROCK, K. 1988. Several 'pathogenesis-related' proteins in potato are 1,3- $\beta$ -glucanases and chitinases. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 85: 782-786.
- KRÖBER, H. 1985. Erfahrungen mit *Phytophthora de Bary* und *Pythium Pringsheim*. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, Heft 225, Paul Parey Verlag, Berlin. Seiten 44-48.
- LANGRIDE, W.H.R., FRITZGERALD, K.J., KONCZ, C., SCHELL, J., SZALAY, A.A. 1989. Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase genes is regulated by plant growth hormones. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86: 3219-3223.
- LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I., MUNDY, J. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (3): 1564-1573.
- LEUBNER-METZGER, G. & MEINS, F. 1999. Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Eds.: Datla, S.K., Muthukrishnan, S., CRC Press, New York. Pages 49-75.
- LINTHORST, H.J.M., DANASH, N., BREDERODE, F.T., VAN KAN, J.A.L., DE WIT, P.J.G.M., BOL, J.F. 1991. Tobacco and tomato PR proteins homologous to WIN and pro-hevein lack the 'hevein' domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 586-592.
- LIU, D., RAGHOTHAMA, K.G., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91: 1888-1892.
- LOGEMANN, J., JACH, G., TOMMERUP, H., MUNDY, J., SCHELL, J. 1992. Expression of a barley ribosome inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology*, 10: 306-308.
- LORITO, M., WOO, S.L., D'AMBROSIO, M., HARMAN, G.E., HAYES, C.K., KUBICEK, C.P., SCALA, F. 1996. Synergistic interactions between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (3): 206-213.
- LOTTMANN, J., HEUER, H., SMALLA, K., BERG, G. 1999. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29 (4): 365-377.
- LUCAS, G.B. & SHEW, H.D. 1991. Foliar diseases caused by fungi. In: *Compendium of tobacco diseases*. Eds.: H.D. Shew and G.B. Lucas. APS Press. Pages 5-17.

- LUND, P., LEE, R.Y., DUNSMUIR, P. 1989. Bacterial chitinase is modified and secreted in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 91: 130-135.
- MAJEAU, N., TRUDEL, J., ASSELIN, A. 1990. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant Science*, 68: 9-16
- MARCHANT, R., DAVEY, M.R., LUCAS, J.A., LAMB, C.J., DIXON, R.A., POWER, J.B. 1998. Expression of chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding*, 4: 187-194.
- MAUCH, F., HADWIGER, L.A., BOLLER, T. 1988a. Antifungal hydrolases in pea tissue; I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3-glucanases differentially regulated during development and response to fungal infection. *Plant Physiology*, 87: 325-333.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B., BOLLER, T. 1988b. Antifungal hydrolases in pea tissue; II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology*, 88: 936-942.
- MCLEISH, M.J., NIELSEN, K.J., WADE, J.D., CRAIK, D.J. 1993. A peptide corresponding to the N-terminal 13 residues of T4 lysozyme from an  $\alpha$ -helix. *FEBS Letters*, 315 (3): 323-328.
- MEINS, F. & AHL, P. 1989. Induction of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Science*, 61: 155-161.
- MELCHERS, L.S., APOTHEKER-DE GROOT, M., VAN DER KNAAP, J.A., PONSTEIN, A.S., SELA-BUURLAGE, M.B., BOL, J.F., CORNELISSEN, B.J.C., VAN DEN ELZEN, P.J.M., LINTHORST, H.J.M. 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinase displays antifungal activity. *The Plant Journal*, 5 (4): 469-480.
- NAKAJIMA, H., MURANAKA, T., ISHIGE, F., AKUTSU, K., OEDA, K. 1997. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. *Plant Cell Report* 16: 674-679.
- NEUHAUS, J.M., AHL-GOY, P., HINZ, U., FLORES, S., MEINS, F. 1991. High-level expression of tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*, 16: 141-151.
- NEUHAUS, J.M., FLORES, U., KEEFE, D., AHL-GOY, P., MEINS, F. 1992. The function of vacuolar  $\beta$ -1-3-glucanase investigated by antisense transformation. Susceptibility of transgenic *Nicotiana glauca* plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*, 19: 803-813.
- NEUHAUS, J.M. 1999. Plant Chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Eds.: Datla, S.K., Muthukrishnan, S., CRC Press, New York. Pages 77-105.
- NIDERMAN, T., GENETET, I., BRUYERE, T., GEES, R., STINTZI, A., LEGRAND, M., FRITIG, B., MOSINGER, E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiology*, 108: 17-27.
- NYVALL, R.F. 1989. Diseases of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Field Crop Diseases Handbook*, 2nd edition, AVI Book, Van Nostrand Reinhold, New York. Pages 671-673.
- ODELL, J.T., NAGY, F., CHUA, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810-812.
- OHSHIMA, M., MITSUHARA, I., OKAMOTO, M., SAWANO, S., NISHIYAMA, K., KAKU, H., NATORI, S., OHASHI, Y., 1999. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants

- overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *Journal of Biochemistry*, 125 (3): 431-435.
- OKAMOTO, M., MITSUHASHI, I., OHSHIMA, M., NATORI, S., OHASHI, Y., 1998. Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant & Cell Physiology*, 39 (1): 57-63.
- ORDENTLICH, A., ELAD, Y., CHET, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 78: 84-88.
- PAYNE, G., WARD, E., GAFFNEY, T., AHL-GOY, P., MOYER, M., HARPER, A., MEINS, F., RYALS, J. 1990. Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 15: 797-808.
- PELLEGRINI, A., THOMAS, U., VON FELLEBERG, R., WILD, P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 180-187.
- PELLEGRINI, A., THOMAS, U., BRAMAZ, N., KLAUSER, S., HUNIZKER, P., VON FELLEBERG, R. 1997. Identification and isolation of a bacterial domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 372-378.
- PIERPOINT, W.S., ROBINSON, N.P., LEASON, M.B. 1981. The pathogenesis-related proteins of tobacco: their induction by viruses in intact plant and their induction by chemicals in detached leaves. *Physiological Plant Pathology*, 19: 85-97.
- PONSTEIN, A.S., BRES-VLOEMANS, A.A., SELA-BUURLAGE, M.B. CORNELISSEN, B.J.C., MELCHERS, L.S. 1994. The "missing" class I PR-4 protein from tobacco exhibits antifungal activity. *Journal of Cellular Biochemistry Suppl.* 18A: 90.
- PORSCH, P., JAHNKE, A., DÜRING, K. 1998. A plant transformation vector with a minimal T-DNA. II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 37: 581-585.
- PRELL, H.H. 1996. Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. Seiten 9-58.
- PROCTOR, V.A., CUNNINGHAM, F.E., FUNG, D.Y.C. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 26 (4): 359-395.
- PUNJA, Z.K. & ZHANG, Y.Y. 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology*, 25 (4): 526-540.
- PUNJA, Z.K. & RAHARJO, S.H.T. 1996. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Disease*, 80: 999-1005.
- RAIKHEL, N.V., LEE, H.-I., BROEKAERT, W.F. 1993. Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology*, 44: 591-615.
- REED, J.D., EDWARDS, D.L., GONZALEZ, C.F. 1997. Synthetic peptide combinatorial libraries: A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 537-549.
- RICH, A.E. 1983. Potato Diseases. Academic Press, New York. Pages 45-55.
- ROBERTS, W.K. & SELITRENNIKOFF, C.P. 1986. Plant proteins that inactivate foreign ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 880: 161-170.



- ROTEM, J. 1994. 13. Our knowledge of *Alternaria* pathogens and diseases. In: The Genus *Alternaria*, Ed: J. Rotem, APS Press. Pages 221-260.
- ROTH, L., FRANK, H., KORMANN, K. 1990. Giftpilze, Pilzgifte: Schimmelpilze, Mycotoxine; Vorkommen, Inhaltsstoffe, Pilzallergien, Nahrungsmittelvergiftungen. Ecomed Verlagsgesellschaft. Seite 168.
- SALMERON J.M. & VERNOOIJ, B. 1998. Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 347-352.
- SANGER, M., DAUBERT, S., GOODMAN, R.M. 1990. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Molecular Biology*, 14: 433-443.
- SCHEFFER, R.P. 1997. The nature of disease in plants: 9. Pathogens overtake movement of crop plants. Cambridge University Press. Pages 125-133.
- SCHLEGEL, H.G. & SCHMIDT, K. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 2.2 Die Prokaryotische Zelle (Protocyte). Thieme Verlag, Stuttgart. Seiten 18-77.
- SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VÖGELI, U., BOLLER, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 324: 365-367.
- SCHÖBER, B. & ULLRICH, J. 1985. Keimung der Sporangien von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf Kartoffelblatt- und Knollengewebe. *Potato Research*, 28: 527-530.
- SCHÖBER-BUTIN, B., 1998. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary: Zur Geschichte der Kraut- und Braunfäule der Kartoffel. 100 Jahre Pflanzenschutzforschung. Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. Parey Buchverlag, Berlin. Seiten 8-30.
- SELA-BUURLAGE, M., PONSTEIN, A.S., BRES-VLOEMANS, S.A., MELCHERS, L.S., VAN DEN ELZEN, P.J.M., CORNELISSEN, B.J.C. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, 101: 857-863.
- SERRANO, C., ARCE-JOHNSON, P., TORRES, H., GEBAUER, M., GUTIERREZ, M., MORENO, M., JORDANA, X., VENEGAS, A., KALAZICH, J., HOLUIGUE, L., 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *American Journal of Potato Research*, 77 (3): 191-197.
- SHEW, H.D. 1991. Root and stem diseases caused by fungi. In: Compendium of tobacco diseases. Eds.: H.D. Shew and G.B. Lucas. APS Press. Pages 17-29.
- SHEWRY, P.R & LUCAS, J.A. 1997. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research*, 26: 135-192.
- STEINRAUF, L.K., SHIUAN, D., YANG, W.-J., CHIANG, M. 1999. Lysozyme association with nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266: 366-370.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defence against pathogens. *Biochimie*, 75: 687-706.
- STIRPE, F. & BARBIERI, L. 1986. Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS*, 195: 1-8.
- STIRPE, F. & HUGHES, C. 1989. Specificity of ribosome-inactivating proteins with N-glycosidase activity. *Biochemical Journal*, 262: 1001-1002.

- STIRPE, F., BARBIERI, L., BATELLI, M.L., SORIA, M., LAPPI, D.A. 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology*, 10: 405-412.
- SUSLOW, T.V., MATSUBARA, D., JONES, J., LEE, R. DUNSMUIR, P. 1988. Effect of expression of bacterial chitinase on tobacco susceptibility to leaf spot, *Alternaria longipes*. *Phytopathology*, 78: 1556.
- TERAKAWA, T., TAKAYA, N., HORIUCHI, H., KOIKE, M., TAKAGI, M. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 16: 439-443.
- TÖPFER, R., MATZEIT, V., GRONENBORN, B., SCHELL, J., STEINBISS, H.-H. 1987. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusion. *Nucleic Acids Research*, 15 (14): 5890.
- TROGNITZ, B.R. 1998. Inheritance of resistance in potato to lesion expansion and sporulation by *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 47 (6): 712-722.
- TRUDEL, J., AUDY, P., ASSELIN, A. 1989. Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthi-nc tobacco, healthy and infected with TMV. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2 (6): 315-324.
- TRUDEL, J., POTVIN, C., ASSELIN, A. 1992. Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco. *Plant Science*, 87: 55-67.
- TRUDEL, J., POTVIN, C., ASSELIN, A. 1995. Secreted hen lysozyme in transgenic tobacco: recovery of bound enzyme and in vitro growth inhibition of plant pathogens. *Plant Science*, 106: 55-62.
- TSUGITA, A. 1971. Phage lysozyme and other lytic enzymes. *The Enzymes V*. Academic Press. Pages 343-411.
- UMAERUS, V. & LIHNELL, D. 1976. A laboratory method for measuring the degree of attack by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 19: 91-107.
- UMAERUS, V., UMAERUS, M., ERJEFÄLT, L., NILSON, B.A. 1983. Control of *Phytophthora* by host resistance: problems and progress. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 315-326.
- VAN DEN HEUVEL J., & WATERREUS, L.P. 1983. Conidial concentration as an important factor determining the type of prepenetration structures formed by *Botrytis cinerea* on french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Pathology*, 32: 263-272.
- VAN LOON L.C. & VAN KAMMEN, A. 1970. Polyacryle amide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II Changes in protein construction after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40: 199-211.
- VAN LOON, L.C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4: 111-116.
- VAN LOON, L.C. & VAN STRIEN, E.A. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Pathology*, 55: 85-97.
- VERHOEFF, K. 1980. The infection process and host-pathogen interactions. In: *The Biology of Botrytis*. Eds.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., and Jarvis, W.R., Academic Press, London. Pages 153-180.
- VIDHYASEKARAN, P. 1997. IV Pathogenesis-related proteins and other antifungal proteins. In: *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops (Molecular Biology and Host Defence Mechanisms)*, Marcel Decker Inc., New York. Pages 264-379.

- VILCINSKAS, A. & MATHA, V. 1997. Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defence reactions in *Galleria mellonella*. *Animal Biology*, 6: 19-29.
- VIVANCO, J.M., SAVARY, B.J., FLORES, H.E. 1999. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiology*, 119: 1447-1456.
- VLEESHOUWERS, V.G.A.A., VAN DOOIJEWERT, W., KEIZER, L.C.P., SIJPKES, L., GOVERS, F., COLON, L.T. 1999. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (3): 241-250.
- WARD, E.R., PAYNE, G.B., MOYER, M.B., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., SHARKEY, K.C., BECK, J.J., TAYLOR, H.A.T., AHL-GOY, P., MEINS, F., RYALS, J.A. 1991. Differential regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiology*, 96: 390-397.
- WESTE, G. 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Eds.: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., APS Press. Pages 237-257.
- WOLOSHUK, C.P., MEULENHOF, J.S., SELA-BUURLAGE, M., VAN DER ELZEN, P.J.M., CORNELLISSSEN, G.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 3: 619-628.
- WUBBEN, J.P., BOLLER, T., HONÉE, G., DE WILT, P.J.G.M. 1997. Molecular and biochemical aspects of host-pathogen-interactions. With prospects for molecular resistance breeding. In: *Resistance of crop plants against fungi*. Gustav Fischer Verlag, Jena. Pages 202-237.
- YE, X.S., PAN, S.Q., KUC, J. 1989. Pathogenesis-related proteins and systemic resistance to blue mould and tobacco mosaic virus induced by tobacco mosaic virus, *Peronospora tabacina* and aspirin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35: 161-175.
- YOSHIKAWA, M., TSUDA, M., TAKEUCHI, Y. 1993. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, from soybean. *Zeitschrift für Naturwissenschaften*, 80: 417-420.
- YUN, D.-J., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. 1997. Plant antifungal proteins. *Plant Breeding Reviews*, 14: 39-87.
- ZHANG, Z. 1998. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 88: 730-734.
- ZHU, Q., MAHER, E.A., MASOUD, S., DIXON, R.A., LAMB, C.J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology*, 12: 807-812.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1996 bis Januar 1999 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln in der Arbeitsgruppe ‚Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz‘ unter der Leitung von Herrn Dr. Werner Gieffers angefertigt.

Dr. Gieffers, Dr. Jach und Dr. Düring danke ich für die Vergabe des interessanten Themas.

Für die Betreuung an der Universität Bonn danke ich meinem Mentor am Institut für Pflanzenkrankheiten Herrn Prof. Dr. Dehne.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Werner Gieffers für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Klaus Düring, Dr. Petra Porsch und Dr. Andreas Mahn für die gute Zusammenarbeit im Lysozym-Projekt. Darüberhinaus danke ich Dr. Klaus Düring für die Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit der Fortführung meiner Arbeit bei MPB Cologne GmbH.

Dr. Guido Jach und den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe ‚Molekulare Resistenzzüchtung‘ am MPI für Züchtungsforschung Köln danke ich für die Einführung in neue Arbeitstechniken.

Besonders herzlich danke ich meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre.